



**HAL**  
open science

# Apport des sciences omiques dans la maladie de Fabry

Sarah Snanoudj-Verber

► **To cite this version:**

Sarah Snanoudj-Verber. Apport des sciences omiques dans la maladie de Fabry. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2023. Français. NNT : 2023NORMR076 . tel-04465066

**HAL Id: tel-04465066**

**<https://theses.hal.science/tel-04465066v1>**

Submitted on 19 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.



# 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**

## Apport des sciences omiques dans la maladie de Fabry

Présentée et soutenue par  
**SARAH SNANOUDJ**

**Thèse soutenue le 18/10/2023**  
devant le jury composé de :

M. JEROME AUSSEIL	Professeur des Univ - Prat Hospitalier - UNIVERSITE TOULOUSE 3 PAUL SABATIER	Rapporteur du jury
M. CYRIL GOIZET	Professeur des Univ - Prat Hospitalier - UNIVERSITE DE BORDEAUX	Rapporteur du jury
M. ABDELLAH TEBANI	Maître de Conf Univ - Prat Hospitalier - Université de Rouen Normandie	Membre du jury
MME NATHALIE BEDNAREK-WEIRAUCH	Professeur des Univ - Prat Hospitalier - UNIVERSITE REIMS CHAMPAGNE ARDENNE	Président du jury
MME SOUMEYA BEKRI	Professeur des Univ - Prat Hospitalier - Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse
M. STÉPHANE MARRET	Professeur des Univ - Prat Hospitalier - Université de Rouen Normandie	Co-directeur de thèse

Thèse dirigée par **SOUMEYA BEKRI** (CANCER AND BRAIN GENOMICS) et **STÉPHANE MARRET** (CANCER AND BRAIN GENOMICS)



‘Golpalott’s Third Law ... who can tell me –? But Miss Granger can, of course!’

Hermione recited at top speed: ‘Golpalott’s-Third-Law-states-that-the-antidote-for-a-blended-poison-will-be-equal-to-more-than-the-sum-of-the-antidotes-for-each-of-the-separate-components.’

‘Precisely!’ beamed Slughorn. ‘Ten points for Gryffindor! Now, if we accept Golpalott’s Third Law as true ...’

[...]

‘... which means, of course, that assuming we have achieved correct identification of the potion’s ingredients by Scarpin’s Revelaspell, our primary aim is not the relatively simple one of selecting antidotes to those ingredients in and of themselves, but to find that added component which will, by an almost alchemical process, transform these disparate elements –’

- *Harry Potter and the Half Blood Prince*, J.K. Rowling



## Remerciements

À la présidente du jury, Madame le Professeur Nathalie BEDNAREK-WEIRAUCH. Merci de me faire l'honneur d'accepter de présider mon jury et de juger ce travail. Je vous exprime ma sincère reconnaissance et mon profond respect.

À mes rapporteurs, Monsieur le Professeur Jérôme AUSSEIL et Monsieur le Professeur Cyril GOIZET. Merci de me faire l'honneur de juger ce travail et pour le temps précieux consacré à la relecture de ce manuscrit. Je vous exprime ma sincère reconnaissance et mon profond respect.

À Monsieur le Docteur Abdellah TEBANI. Merci d'avoir accepté de faire partie de mon jury et de juger ce travail ainsi que pour ta contribution et ton encadrement. Je t'exprime ma sincère reconnaissance et mon profond respect.

À mon directeur de thèse, Monsieur le Professeur Stéphane MARRET. Merci pour vos conseils, votre gentillesse et votre soutien tout au long de cette thèse. Je vous exprime ma sincère reconnaissance et mon profond respect.

À ma directrice de thèse, Madame le Professeur Soumeya BEKRI. Merci pour vos conseils, votre accompagnement, ainsi que pour tout ce que vous m'avez appris et votre confiance ces quatre dernières années. Soyez assurée de ma sincère reconnaissance et mon profond respect.

Aux membres de mon comité de suivi de thèse, Monsieur le Professeur Hervé PUY, Monsieur le Professeur Français MAILLOT, Madame Leslie DECKER et Monsieur le Docteur Baptiste PILEYRE. Je vous remercie pour le temps que vous m'avez consacré et pour vos précieux conseils et remarques.

À Madame Lynda LETETU, pour son aide et sa réactivité tout au long de cette thèse.

À Monsieur le Professeur Frédéric BARBEY, pour sa précieuse collaboration, nos échanges lors de P2M, sa gentillesse et ses encouragements.

À toute l'équipe de l'UMR1245, et en particulier à mes co-doctorants, le Dr Ivana DABAJ et le Dr Franklin DUCATEZ. Merci pour votre aide et votre soutien.

Au Professeur Stéphane ALLOUCHE. Je te remercie pour ton soutien toutes ces années, et en particulier pour ton aide inestimable dans cette dernière ligne droite.

À l'équipe du Laboratoire de Biochimie Métabolique. J'aimerais vous exprimer ici ma profonde reconnaissance et mon admiration pour votre implication sans faille, vos compétences, votre soutien, votre bonne humeur et votre amitié. Céline, merci infiniment pour toutes les manips, mais surtout pour ton soutien moral et psychologique et pour avoir pris le temps de relire ma thèse. Thomas, merci beaucoup pour ton aide, ta patience et désolée de toujours t'inclure dans « les filles ». Carine, merci d'être la meilleure co-pilote qualité qu'on puisse avoir, merci pour ton humour et merci d'être la super

tata de Sammy. Merci Nancy pour ton soutien, Loréna pour nos conversations, Déborah pour ton humour, Kenza pour ta gentillesse, Edwige pour ton aide au quotidien, Amélie pour nos échanges. Sans oublier Isabelle, Isa et Pierre-Jean, merci pour les rigolades. Merci pour tout. Et merci à Bénédicte. Tu es incroyable. XOXO (merci d'être la meilleure work wife et un médecin exceptionnel, pour ta bonne humeur, ta franchise, ton soutien, ta confiance, ton investissement, ton amitié).

À mes amies. Aux PhD, Clarisse et Fanny, les meilleures depuis tant d'années. Aux médecins, Andreea et Claire, merci pour votre amitié sans faille. À Anne-Lise, aussi médecin, mais surtout cavalière, merci pour ton soutien (même par vidéos interposées). À mes super copines rouennaises, Aude et Erell, merci pour nos sorties bienveillantes (!!). À Hélène, merci de m'avoir accompagnée dans ma folle aventure de l'autre côté du globe. À Angèle, merci pour cette journée qui a mis des paillettes dans ma vie au moment où elle en avait bien besoin.

À Sammy pour me faire l'honneur d'accepter que j'habite chez elle. À Mika pour son calme, son soutien silencieux et sa présence rassurante.

À ma famille, en particulier aux médecins, Cathy, Nadia et Renaud, qui m'ont soutenue depuis le début.

À Marie. Merci d'être toujours la meilleure des grandes sœurs.

À mes parents. Merci pour votre soutien et votre amour.

À Anas. Thank you for being my person, and sorry for the month away and all the crappy Sundays.

بحبك من هون للقمر روحة رجعة

## Sommaire

Remerciements .....	5
Publications & communications.....	9
Liste des Figures .....	11
Liste des Tableaux .....	13
Principales abréviations .....	15
<b>PARTIE I : INTRODUCTION</b> .....	<b>17</b>
CHAPITRE I : Les maladies héréditaires du métabolisme .....	19
I. Définition et classification .....	19
II. Épidémiologie.....	26
III. Physiopathologie .....	26
IV. Présentations cliniques .....	29
V. Diagnostic et dépistage .....	31
VI. Traitements .....	35
CHAPITRE II : Le lysosome .....	39
I. Histoire du lysosome .....	39
II. Structure et composition.....	42
III. Biologie du lysosome.....	53
IV. Les rôles du lysosome : un régulateur de l'homéostasie cellulaire.....	60
V. Techniques d'études du lysosome .....	67
Conclusion .....	69
CHAPITRE III : Les maladies lysosomales .....	71
I. Histoire des maladies lysosomales.....	71
II. Définition et classification .....	72
III. Mécanismes, physiopathologie.....	74
IV. Diagnostic, dépistage et prévention.....	75
V. Prise en charge .....	79
CHAPITRE IV : La maladie de Fabry .....	97
I. Les sphingolipides.....	97
II. Les sphingolipidoses .....	103
III. La maladie de Fabry.....	105
IV. Mode de transmission.....	108
V. L'alpha galactosidase A .....	109
VI. Physiopathologie .....	113

VII.	Présentations cliniques .....	115
VIII.	Diagnostic .....	128
IX.	Traitements .....	136
X.	Maladies rares et maladies complexes : Fabry et Parkinson .....	145
XI.	Registres Fabry .....	146
<b>CHAPITRE V : Les sciences omiques .....</b>		<b>149</b>
I.	Définition, étymologie et historique .....	149
II.	La biologie des systèmes .....	150
III.	Médecine des systèmes et médecine de précision.....	155
IV.	Les sciences omiques .....	160
<b>CHAPITRE VI : Techniques omiques utilisées dans le cadre de cette thèse .....</b>		<b>179</b>
I.	Technique de dosage ciblée de protéines par technologie multiplex (MSD) .....	179
II.	Transcriptomique par RNA-seq .....	183
III.	Métabolomique ciblée par kit Biocrates .....	188
<b>OBJECTIFS DE LA THESE .....</b>		<b>195</b>
<b>PARTIE II : SECTION EXPERIMENTALE .....</b>		<b>197</b>
<b>CHAPITRE I : « Genome-wide expression analysis in a Fabry disease human podocyte cell line » ....</b>		<b>199</b>
I.	Contexte .....	199
II.	Objectifs.....	199
III.	Résultats .....	199
IV.	Conclusion .....	201
<b>CHAPITRE II : « Exploring FGF2 and IL7 as potential biomarkers of Fabry disease » .....</b>		<b>223</b>
I.	Contexte .....	223
II.	Objectifs.....	223
III.	Résultats .....	224
IV.	Conclusion .....	226
<b>CONCLUSION &amp; PERSPECTIVES.....</b>		<b>251</b>
Bibliographie.....		261

## Publications & communications

### Publications

#### *Publications en lien avec ce travail de thèse*

1. **Snanoudj S**, Derambure C, Zhang C, Lesueur C, Abily-Donval L, Marret S, Yang H, Mardinoglu A, Bekri S, Tebani A. **Genome-wide expression analysis in a Fabry disease human podocyte cell line**. *In preparation*
2. **Snanoudj S**, Barbey F, Boullier A, Lesueur C, Pilon C, Plichet T, Noel E, Perrichot R, Labombarda F, Nguyen A, Merret S, Bekri S, Tebani A. **Exploring FGF2 and IL7 as potential biomarkers of Fabry disease**. *In preparation*

#### *Publications en rapport avec le sujet de la thèse (sciences omiques, maladies héréditaires du métabolisme)*

1. Staklinski SJ, **Snanoudj S**, Guerrot AM, Vanhulle C, Lecoquierre F, Bekri S, Kilberg MS. Analysis of Enzyme Activity and Cellular Function for the N80S and S480F Asparagine Synthetase Variants Expressed in a Child with Asparagine Synthetase Deficiency. *Int J Mol Sci*. 2022 Dec 29;24(1):559. doi: 10.3390/ijms24010559
2. Ben Younes T, Kraoua I, **Snanoudj S**, Klaa H, Benrhouma H, Rouissi A, Caillaud C, Chaabouni M, Miladi N, Bekri S, Ben Youssef-Turki I. Neuronal ceroid-lipofuscinosis: clinical, electroencephalographic, imaging and genetic study of a maghrebian series. *Clin Gen*. 2022 Aug;102(2):157-160. doi: 10.1111/cge.14145
3. **Snanoudj S**, Torre S, Sudrié-Arnaud B, Abily-Donval L, Goldenberg A, Salomons GS, Marret S, Bekri S, Tebani A. Heterogenous Clinical Landscape in a Consanguineous Malonic Aciduria Family. *Int J Mol Science* 2021, 22(23), 12633. doi: 10.3390/ijms222312633
4. Sudrié-Arnaud B, Legendre M, **Snanoudj S**, Pelluard F, Bekri S, Tebani A. An atypical case of congenital erythropoietic porphyria. *Genes (Basel)*. 2021 Nov 19;12(11):1828. doi: 10.3390/genes12111828
5. Tebani A, Sudrié-Arnaud B, Boudabous H, Brassier A, Anty R, **Snanoudj S**, Abergel A, Abi Warde MT, Bardou-Jacquet E, Belbouab R, Blanchet E, Borderon C, Bronowicki JP, Cariou B, Carette C, Dabbas M, Dranguet H, de Ledinghen V, Ferrières J, Guillaume M, Krempf M, Lacaille F, Larrey D, Leroy V, Musikas M, Nguyen-Khac E, Ouzan D, Perarnau JM, Pilon C, Ratzlu V, Thebaut A, Thevenot T, Tragin I, Triolo V, Vergès B, Vergnaud S, Bekri S. Large-scale screening of lipase acid deficiency in at risk population. *Clin Chim Acta*. 2021 Aug;519:64-69. doi: 10.1016/j.cca.2021.04.005
6. 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. *Life* 2021 Feb 27;11(3):187.doi: 10.3390/life11030187

7. Sudrié-Arnaud B, **Snanoudj S**, Imbard A, Dabaj I, Tebani A. An Unusual Peak in a Common Clinical Presentation. *Clin Chem*. 2021 Apr 29;67(5):799-801. doi: 10.1093/clinchem/hvab012.
8. Tebani A, Sudrié-Arnaud B, Dabaj I, Torre S, Domitille L, **Snanoudj S**, Heron B, Levade T, Caillaud C, Vergnaud S, Saugier-Veber P, Coutant S, Dranguet H, Froissart R, Al Khouri M, Alembik Y, Baruteau J, Arnoux JB, Brassier A, Brehin AC, Busa T, Cano A, Chabrol B, Coubes C, Desguerre I, Doco-Fenzy M, Drenou B, Elcioglu NH, Elsayed S, Fouilhoux A, Poirsier C, Goldenberg A, Jouvencel P, Kuster A, Labarthe F, Lazaro L, Pichard S, Rivera S, Roche S, Roggerone S, Roubertie A, Sigaudy S, Spodenkiewicz M, Tardieu M, Vanhulle C, Marret S, Bekri S. Disentangling molecular and clinical stratification patterns in beta-galactosidase deficiency. *J Med Genet* 2021 Mar 18:jmedgenet-2020-107510. doi: 10.1136/jmedgenet-2020-107510
9. Sudrié-Arnaud B, **Snanoudj S**, Dabaj I, Dranguet H, Abily-Donval L, Lebas A, Vezain M, Héron B, Marie I, Duval-Arnould M, Marret S, Tebani A, Bekri S. Next-Generation Molecular Investigations in Lysosomal Diseases: Clinical Integration of a Comprehensive Targeted Panel. *Diagnostics* 2021 Feb 12;11(2):294. doi: 10.3390/diagnostics11020294
10. Chen X, **Snanoudj-Verber S**, Pollard L, Hu Y, Cathey SS, Gray SJ. Preclinical gene therapy with AAV9/AGA in aspartylglucosaminuria mice provides evidence for clinical translation. *Mol Ther*. 2020 Nov 11:S1525-0016(20)30610-9. doi: 10.1016/j.ymthe.2020.11.012

## **Présentations**

### *Communications orales*

- Congrès annuel de la SFEIM (Société Française des Erreurs Innées du Métabolisme) 2021 : communication orale et animation d'atelier
- Assises de génétique 2020, Tours, France

### *Communications affichées*

- ESHG (European Society of Human Genetics) meeting 2022, Vienne, Autriche

## Liste des Figures

Figure 1. Schéma du catabolisme des substrats apportés par l'alimentation. ....	20
Figure 2. Graphique des catégories de MHM de l'ICIMD avec zoom sur la dégradation des molécules complexes.....	25
Figure 3. Schéma d'un déficit enzymatique sur une voie métabolique. ....	28
Figure 4. Un exemple d'algorithme pour le diagnostic de MHM dans le cadre de mouvements anormaux à début pédiatrique. ....	33
Figure 5. Algorithme diagnostique dans les MHM. ....	34
Figure 6. Approches thérapeutiques dans les MHM.....	36
Figure 7. Protocole de fractionnement cellulaire, 1946. ....	40
Figure 8. Le Roi de Suède Carl Gustav et Christian de Duve en 1974 à la cérémonie organisée à Stockholm pour les nouveaux lauréats des Prix Nobel. ....	41
Figure 9. Lysosomes en microscopie électronique. ....	43
Figure 10. Composition lipidique des membranes biologiques. ....	44
Figure 11. Vue d'ensemble schématique des transporteurs lysosomaux pour (A) les acides aminés et (B) les monosaccharides. ....	48
Figure 12. Lésion d'athérosclérose précoce dans l'aorte d'un pigeon de Carneau blanc en photomicrographie.....	50
Figure 13. Endocytose et maturation endosomale. ....	52
Figure 14. Événements moléculaires au cours des différents modèles de la biogenèse des lysosomes. ....	54
Figure 15. Modulation de la position des lysosomes et de l'activité de mTORC1 en fonction de l'état nutritionnel de la cellule.....	56
Figure 16. Les lysosomes déplacés à la périphérie de la cellule par l'expression d'Arl8b sont plus alcalins. ....	57
Figure 17. Sites de contact entre lysosome et réticulum endoplasmique. ....	58
Figure 18. Colorant complexe d'iridium(III) pour le suivi des contacts mitochondrie-lysosome.....	59
Figure 19. Voies de l'autophagie chez les mammifères. ....	61
Figure 20. Les fonctions multiples du lysosome. ....	63
Figure 21. Modèle de réparation de la membrane plasmique par la sphingomyélinase acide sécrétée .....	65
Figure 22. Régulation dépendante du lysosome de la physiologie cellulaire en réponse aux nutriments. ....	67
Figure 23. Propriétés des lysosomes. ....	70
Figure 24. L'évolution des connaissances sur les ML. ....	72
Figure 25. Organes affectés dans les maladies lysosomales. ....	76
Figure 26. Nouvelles technologies pour étudier les ML. ....	77
Figure 27. Correction croisée des enzymes lysosomales. ....	80
Figure 28. Les mécanismes impliqués dans la physiopathologie des ML. ....	84
Figure 29. Structure d'un sphingolipide générique.....	97
Figure 30. Différents types de glycosphingolipides.....	98
Figure 31. Biosynthèse des sphingolipides et des glycosphingolipides. ....	100
Figure 32. Pathologies résultant de déficits dans la voie de synthèse du céramide et les glycosphingolipides et dans la voie de dégradation non lysosomale des sphingolipides. ....	101
Figure 33. Voies métaboliques des différentes formes de sphingolipides. ....	102
Figure 34. Johannes Fabry (à gauche) et William Anderson (à droite). ....	105

Figure 35. Histoire de la maladie de Fabry. ....	106
Figure 36. Inactivation de l’X chez les femmes en bonne santé. ....	109
Figure 37. Quelques variants clés associés au phénotype classique ou tardif de la maladie de Fabry, des variants GLA de signification indéterminée (VSI ou VUS) et des variants bénins. ....	110
Figure 38. Voie métabolique impliquée dans la maladie de Fabry .....	111
Figure 39. Vue d’ensemble du dimère de l’ $\alpha$ -galactosidase A. ....	112
Figure 40. Le mécanisme catalytique de l’ $\alpha$ -galactosidase A.....	113
Figure 41. Symptômes de la maladie de Fabry. ....	116
Figure 42. AVC chez un patient atteint de la maladie de Fabry. ....	117
Figure 43. Angiokératomes .....	119
Figure 44. Cornée d’une patiente hétérozygote. ....	120
Figure 45. IRM cardiaque pour le bilan de l’hypertrophie et de la fibrose ventriculaire gauche. ....	122
Figure 46. Biopsie rénale. ....	123
Figure 47. Âge moyen d’apparition des premiers symptômes de la forme classique de la maladie de Fabry.....	125
Figure 48. Algorithme diagnostique de la maladie de Fabry chez l’homme et la femme.....	129
Figure 49. Schéma des voies de réponse pathogènes. ....	132
Figure 50. Extension du dépistage de la maladie de Fabry.....	133
Figure 51. Vue d'ensemble de la voie des céramides et des cibles thérapeutiques des traitements spécifiques de la maladie de Fabry. ....	137
Figure 52. Localisation des essais cliniques pour le traitement de la maladie de Fabry et autres sphingolipidoses par thérapie génique. ....	143
Figure 53. Le registre Fabry : Utilisation de données du monde réel dans des collaborations multipartites mondiales. ....	147
Figure 54. Vue d'ensemble de la biologie multi-échelle de la médecine systémique. ....	150
Figure 55. Méthodes de détection des anomalies basées sur un ensemble de données. ....	156
Figure 56. Deep learning pour l’identification de profils de biomarqueurs.....	157
Figure 57. Le système de santé basé sur les sciences omiques. ....	158
Figure 58. Représentation de l’interaction entre le défi de la complexité et l’exigence de la précision de la médecine moderne.....	159
Figure 59. Protéomes de cellules HeLa et U2OS humaines. ....	167
Figure 60. Workflow ciblé et non ciblé pour la métabolomique basée sur la LC-MS. ....	172
Figure 61. Intégration des données omiques.....	175
Figure 62. L’intégration de différents types de données omiques peut être utilisée pour déduire les distributions de flux métaboliques intracellulaires en fonction des tissus et des conditions. ....	178
Figure 63. Principe de fonctionnement de la technologie MSD .....	179
Figure 64. Puits des plaques MULTI-SPOT.....	180
Figure 65. Principe de fonctionnement des anticorps utilisés en ELISA. ....	180
Figure 66. Technologie ECL.....	181
Figure 67. MESO QuickPlex SQ 120MM. ....	182
Figure 68. Protocole d'essai ECL.....	182
Figure 69. Principales étapes de la préparation de librairie pour le RNA-seq. ....	184
Figure 70. Principe du séquençage par RNA-Seq utilisant la technique SBS avec technologie Illumina. ....	186
Figure 71. Formation d'ions.....	189
Figure 72. Schéma du triple quadripôle (Q1-Q2-Q3) du spectromètre de masse API 4000™. ....	190
Figure 73. Principe du triple quadripôle.....	190
Figure 74. Plan d’une plaque du kit AbsoluteIDQ p180. ....	192

Figure 75. Étapes de préparation des échantillons pour l'analyse par kit Biocrates AbsoluteIDQ®p180. ....	193
Figure 76. Représentation du changement de paradigme dans l'exemple du diagnostic des maladies héréditaires du métabolisme. ....	257
Figure 77. Augmentation exponentielle des publications scientifiques avec approches omiques. ...	259

## Liste des Tableaux

Tableau 1. Les 24 catégories de l'ICIMD.....	24
Tableau 2. Exemples de présentations cliniques dans les MHM. ....	30
Tableau 3. Augmentation de l'incidence des ML dans des populations spécifiques. ....	73
Tableau 4. Thérapies spécifiques approuvées pour les ML (liste non exhaustive). ....	82
Tableau 5. Maladies lysosomales et des organelles associées aux lysosomes .....	85
Tableau 6. Description des sphingolipidoses. ....	103
Tableau 7. Etudes de prévalence de la maladie de Fabry.....	107
Tableau 8. Médicaments disponibles et expérimentaux pour le traitement de la maladie de Fabry avec leur mécanisme d'action, voie d'administration et effets physiologiques. ....	137
Tableau 9. Recommandations pour l'initiation et l'arrêt de l'enzymothérapie substitutive chez les patients atteints de la maladie de Fabry.....	140
Tableau 10. Classes des analytes étudiés et méthode analytique.....	191



## Principales abréviations

AA	Acides aminés
AAV	<i>Adenoassociated virus</i> (virus adéno-associé)
ADN	Acide désoxyribonucléique
AG	Acides gras
AL	Autolysosome
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ATP	Adénosine triphosphate
CCV	<i>Clathrin-coated vesicles</i>
CerS	Céramide synthase
CLEAR	<i>Coordinated lysosomal expression and regulation</i>
CLN	Céroïde lipofuscine neuronale
CMA	<i>Chaperone-mediated autophagy</i>
ECL	Electrochimiluminescence
ECV	<i>Endosomal carrier vesicle</i>
EE	<i>Early endosomes</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERT	<i>Enzyme replacement therapy</i> (enzymothérapie substitutive)
ESI	<i>Electrospray ionisation</i>
FD	<i>Fabry disease</i> (maladie de Fabry)
FIA	<i>Flow injection analysis</i>
FOS	<i>Fabry Outcome Survey</i>
Gb3 ou GL3	Globotriaosylcéramide
GEM	<i>Genome-scale metabolic modeling</i>
GlcCer	Glucosylcéramide
GWAS	<i>Genome wide association studies</i>
HSCT	<i>Hematopoietic stem cell transplant</i> (greffe de cellules souches hématopoïétiques)
ICIMD	<i>International Classification of Inherited Metabolic Disorders</i>
IEM	<i>Inborn errors of metabolism</i>
ILV	<i>Intraluminal vesicles</i>
IMD	<i>Inherited metabolic disorders</i>
IMVG	Indice de masse du ventricule gauche
iPSC	<i>Induced pluripotent stem cells</i> (cellules souches pluripotentes induites humaines)
LAL	Lipase acide lysosomale
LAMP	<i>Lysosome associated protein</i>
LC	Chromatographie liquide
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LE	<i>Late endosomes</i>
LIMP	<i>Lysosomal integral membrane protein</i>
LRO	<i>Lysosome-related organelles</i>
LV	Lentivirus
Lyso-Gb3	Globotriaosylsphingosine
M6PR	Récepteurs au mannose-6-phosphate

MCS	<i>Membrane contact sites</i>
MHM	Maladies héréditaires du métabolisme
miARN	micro ARN
ML	Maladies lysosomales
MPS	Mucopolysaccharidose
MS	<i>Mass spectrometry</i>
MSD	<i>Meso Scale Discovery</i>
mTORC1	<i>Mammalian target of rapamycin complex 1</i>
MVB	<i>Multivesicular bodies</i>
NGS	<i>Next generation sequencing</i>
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i>
NPC	Maladie de Niemann-Pick de type C
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PIP	Phosphoinositides
RE	Réticulum Endoplasmique
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RUSP	<i>Recommended Uniform Screening Panel</i>
SBS	<i>Sequencing by synthesis</i>
SNC	Système nerveux central
SRT	<i>Substrate reduction therapy</i>
TFEB	<i>Transcription factor EB</i>
TG	Triglycérides
TGN	<i>Trans-golgi network</i>
TLR	<i>Toll like receptor</i>
VG	Ventricule gauche
VSI	Variant de signification indéterminée ou inconnue
WES	<i>Whole exome sequencing</i>
WGS	<i>Whole genome sequencing</i>
α-GAL	α-galactosidase A

## PARTIE I : INTRODUCTION



# CHAPITRE I : Les maladies héréditaires du métabolisme

## I. Définition et classification

### 1. Introduction aux maladies héréditaires du métabolisme

Les maladies héréditaires du métabolisme (MHM ; *inborn errors of metabolism*, IEM, ou *inherited metabolic disorders*, IMD, en anglais) sont un groupe hétérogène de maladies génétiques rares qui affectent la capacité du corps à métaboliser les nutriments ou à fabriquer, décomposer, recycler ou utiliser les composants cellulaires. Près de 1 500 MHM sont décrites<sup>1</sup>. Ces pathologies résultent majoritairement de déficits enzymatiques, qui sont des protéines qui catalysent les réactions biochimiques nécessaires au métabolisme, ou dans les transporteurs, qui sont responsables du déplacement des molécules à l'intérieur et à l'extérieur des cellules ou des compartiments cellulaires<sup>2</sup>.

Les MHM peuvent affecter n'importe quelle voie métabolique – métabolisme des glucides, protéines, lipides, mais également vitamines, métaux etc. – et intéresser n'importe quel tissu ou organe.

### 2. Les métabolismes

Le métabolisme cellulaire fait référence aux processus biochimiques qui se produisent dans une cellule pour maintenir sa vie et sa fonction. Ces processus impliquent la conversion de nutriments et d'autres molécules en énergie et en blocs de construction pour la croissance, l'entretien et la réparation des cellules.

Il existe deux grands versants du métabolisme cellulaire : le catabolisme et l'anabolisme. Le catabolisme implique la décomposition de molécules complexes en molécules plus simples, généralement avec libération d'énergie. L'anabolisme implique la synthèse de molécules complexes à partir de molécules plus simples, nécessitant généralement de l'énergie.

Le métabolisme est étroitement régulé pour garantir que la cellule puisse s'acquitter efficacement de ses diverses fonctions et s'adapter aux conditions environnementales.

Le métabolisme intermédiaire peut être défini comme l'ensemble des réactions de dégradation (catabolisme) et de synthèse (anabolisme) qui permettent un cycle continu d'échanges entre la cellule

et les substrats apportées par l'alimentation : glucides, lipides et protides. Plusieurs voies interconnectées sont impliquées telles que la glycolyse, le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative (**Figure 1**). Ces processus sont étroitement régulés afin de garantir l'homéostasie de la cellule, en termes d'énergie et de nutriments. Le métabolisme intermédiaire joue un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie cellulaire et la production d'énergie et de composants cellulaires nécessaires à la croissance, à l'entretien et à la réparation.

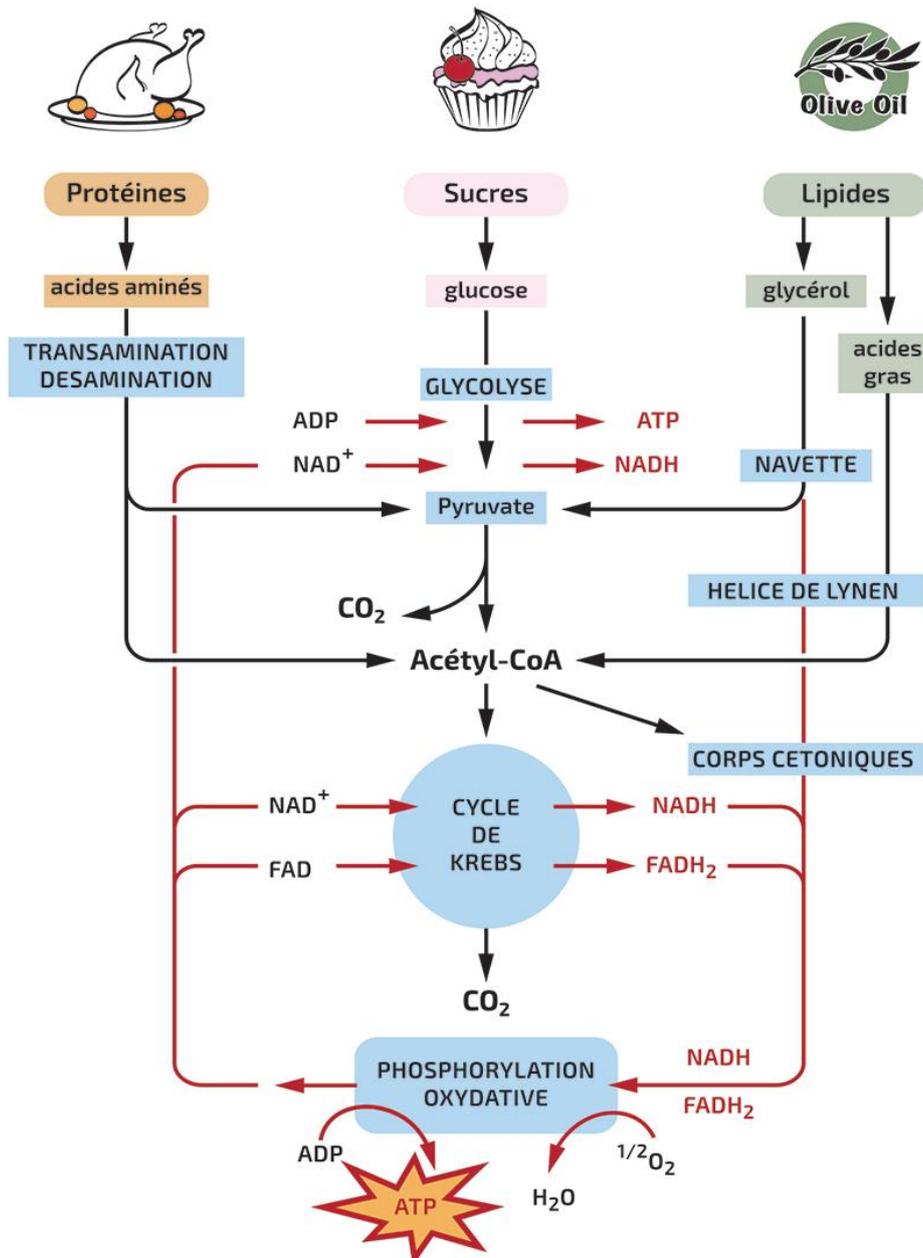


Figure 1. Schéma du catabolisme des substrats apportés par l'alimentation. Les voies cataboliques aboutissent, après oxydation complète, à des produits terminaux communs ( $\text{CO}_2$  et  $\text{H}_2\text{O}$ ) et conduisent à la synthèse d'ATP. Source : <https://rmbio.sorbonne-universite.fr>, les droits de reproduction sont réservés et strictement limités

Mais le métabolisme cellulaire ne se limite pas aux métabolismes des glucides, lipides et protéine et au métabolisme énergétique. Il comprend également le métabolisme des molécules de structure, des molécules participant à la signalisation cellulaire, des acides nucléiques, de l'hème, des molécules complexes (protéines glycosylées), des organites (biogénèse, fonctionnement, interactions avec d'autres organites), des vitamines, des métaux, des neurotransmetteurs, le métabolisme endocrinien, etc.

Habituellement, le métabolisme cellulaire est décrit comme une série linéaire de réactions qui se produisent dans un ordre spécifique, chaque réaction entraînant la suivante dans une voie prédéterminée. Cependant, avec les progrès de la biochimie et de la biologie moléculaire, mais également de la biostatistique et de l'intelligence artificielle, la preuve est faite que le métabolisme cellulaire est beaucoup plus dynamique et complexe que ne le suggère ce modèle linéaire.

Le métabolisme humain est en effet un vaste et complexe réseau d'interactions biochimiques. Ce réseau interconnecté avec de multiples flux et nœuds forme un système hautement dynamique et régulé. Les métabolites sont continuellement transformés et transportés entre les différentes voies métaboliques. Ces transformations constituent des flux métaboliques. Les nœuds sont les points où plusieurs réactions convergent et divergent. Ce sont des métabolites clés qui agissent comme des "carrefours" dans le réseau métabolique, où plusieurs voies métaboliques se croisent. Ces nœuds sont essentiels pour coordonner et réguler les différentes réactions métaboliques. La complexité du réseau métabolique est également due à la régulation étroite de ces flux et nœuds. Le métabolisme doit s'adapter aux changements dans l'environnement, aux besoins énergétiques de la cellule et aux variations des apports alimentaires. Des mécanismes de régulation complexes, impliquant des enzymes, des hormones et d'autres facteurs, tels que des facteurs de transcription, assurent l'équilibre du métabolisme. Ainsi, des perturbations au niveau d'un seul métabolite ou d'une seule voie métabolique peuvent entraîner des conséquences importantes sur l'ensemble du réseau.

La complexité et l'interconnectivité du réseau peuvent être appréhendées grâce à une reconstruction métabolique à l'échelle du génome (*genome-scale metabolic reconstruction*) qui permet de représenter l'ensemble des réactions métaboliques et de transport qui peuvent se produire dans un organisme donné<sup>3</sup>. Un modèle mathématique peut être dérivé d'une telle reconstruction, ce qui permet de simuler le comportement phénotypique d'un organisme dans des conditions particulières<sup>4</sup>.

Cette compréhension dynamique et holistique du métabolisme cellulaire permet de mieux appréhender la complexité des MHM.

### 3. Histoire des MHM

Sir Archibald Edward Garrod (1857-1936), un médecin et chimiste anglais, a le premier utilisé le terme d'erreurs innées du métabolisme (*inborn errors of metabolism*, IEM, pour maladies héréditaires du métabolisme) en 1909<sup>5</sup>. Après la description de l'hérédité mendélienne en 1865, Garrod fut le premier à décrire en 1902 l'individualité chimique et les effets de la consanguinité conduisant à différents phénotypes<sup>6</sup>. Il décrit l'alcaptonurie comme un déficit métabolique rare, héréditaire et récessif dans la dégradation de la tyrosine qui entraîne l'accumulation d'acide homogentisique. La plupart des patients restent asymptomatiques, tandis que d'autres peuvent présenter une pigmentation, une calcification des valves cardiaques, des calculs rénaux et de l'arthrite. Le concept d'individualité chimique dans la pathogenèse de la maladie était remarquable à l'époque. Par la suite, Garrod a étendu ses études à l'albinisme, à la cystinurie et à la porphyrie<sup>5</sup>.

Ses observations n'ont pas donné lieu à de nouveaux travaux avant la seconde moitié du XX<sup>ème</sup> siècle et l'avènement de technologies permettant de nouvelles avancées dans les domaines de la biochimie, de la pathologie, de la génétique et de la radiologie.

Ce n'est que 39 ans après la première description d'une MHM par Garrod que Beadle et Tatum ont établi les bases de la génétique biochimique, démontrant que chaque processus biochimique est contrôlé par un gène ou une protéine spécifique<sup>7</sup>. Il a été suggéré que l'altération d'un gène modifie la fonction biochimique de ce métabolisme, donnant lieu à une maladie<sup>8</sup>. Auparavant, un gène était simplement défini comme un élément structural d'un chromosome. Beadle et Tatum ont donc ajouté une définition fonctionnelle au gène, suggérant qu'un gène peut générer un peptide, qui à son tour se rapporte à une fonction et à une maladie<sup>9</sup>.

### 4. Classification

Les MHM sont traditionnellement divisées en trois grands groupes :

- Les maladies d'intoxication,
- Les maladies énergétiques,
- Les anomalies de synthèse et du catabolisme de molécules complexes.

Cependant cette classification prend en compte principalement les pathologies du catabolisme des molécules et n'intègre pas un certain nombre de déficits de synthèse et de transport. Ces derniers se sont multipliés avec le développement du séquençage à haut débit (NGS) et l'identification d'un nombre croissant de gènes impliqués dans les MHM. Une nouvelle classification basée sur les

caractéristiques biochimiques (synthèse, remodelage, transport, catabolisme, trafic) et non plus sur une approche centrée sur l'organe intéressé a été proposée<sup>10</sup> :

- Maladies impliquant les petites molécules :
  - o Accumulation
  - o Déficit
- Maladies impliquant les molécules complexes :
  - o Accumulation
  - o Déficit
  - o Déficit de transport et des processus cellulaires
- Déficits énergétiques :
  - o Déficits des transporteurs membranaires
  - o Déficits énergétiques cytoplasmiques
  - o Déficits énergétiques mitochondriaux

Cette classification simplifiée a pour but de fournir au clinicien des éléments d'orientation, dans le cadre d'une discipline qui se complexifie au gré des avancées scientifiques, médicales et technologiques.

Une classification internationale plus complète et plus détaillée, regroupant plus de 1 450 maladies héréditaires du métabolisme et divisée en 24 catégories comprenant 124 groupes est disponible<sup>11</sup>. Cette classification permet d'appréhender la complexité du métabolisme cellulaire et l'hétérogénéité des MHM.

Les 24 catégories sont listées dans le **Tableau 1** et les détails sont accessibles sur le site de l'*International Classification of Inherited Metabolic Disorders* (<http://www.icimd.org/>), où les catégories sont représentées sous la forme d'un graphique interactif (**Figure 2**).

Tableau 1. Les 24 catégories de l'ICIMD.<sup>11</sup>

<b>Maladies du métabolisme intermédiaire</b>	<b>Nutriments</b>	Acides aminés
		Peptides et amines
		Glucides
		Acides gras et corps cétoniques
	<b>Énergie</b>	Substrat énergétique
		ADN mitochondrial
		Chaîne respiratoire codée par les gènes nucléaires
		Biosynthèse des cofacteurs
		Maintenance et réplication de l'ADN mitochondrial
		Expression des gènes mitochondriaux
		Autres
	<b>Autres</b>	Réparation des métabolites
		Divers
<b>Maladies du métabolisme et du transport des lipides</b>	Lipides	
	Lipoprotéines	
<b>Maladies du métabolisme des composés hétérocycliques</b>	Bases, nucléotides et acides nucléiques	
	Tétrapyrrole (hème)	
<b>Maladies du métabolisme des molécules complexes et des organites</b>	Glycosylation	
	Biogénèse, dynamique et interactions des organites	
	Dégradation des molécules complexes	
<b>Maladies du métabolisme des cofacteurs et des minéraux</b>	Vitamines et cofacteurs	
	Éléments traces et métaux	
<b>Maladies de la signalisation métabolique cellulaire</b>	Métabolisme des neurotransmetteurs	
	Métabolisme endocrinien	

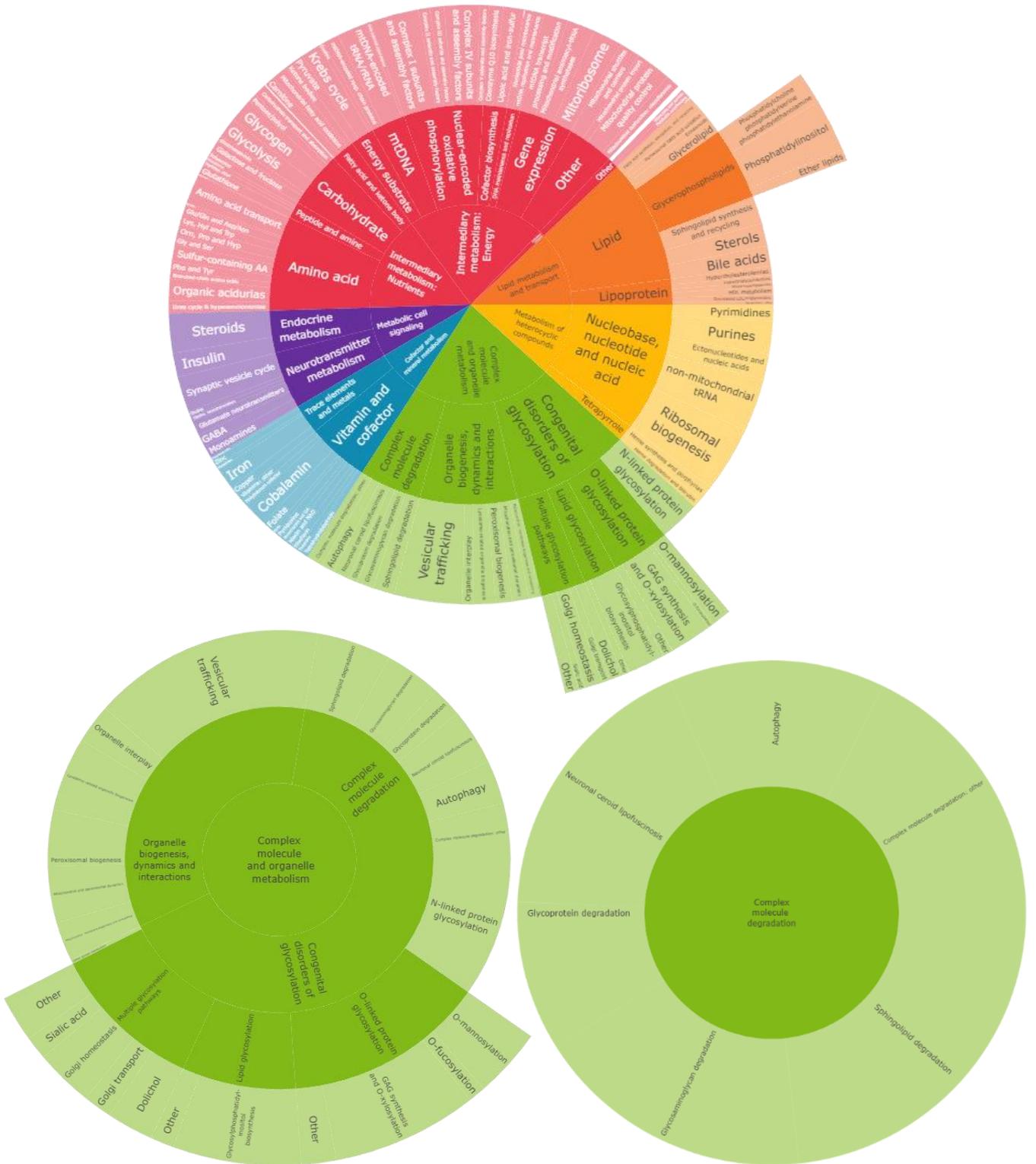


Figure 2. Graphique des catégories de MHM de l'ICIMD avec zoom sur la dégradation des molécules complexes. (<http://www.icimd.org/>)

## II. Épidémiologie

Ce sont des maladies rares (touchant moins d'une personne sur 2 000 en population générale selon la définition européenne) voire ultra-rares (moins de 1 sur 50 000), dont la prévalence varie en fonction de la pathologie et de la population étudiée, avec des phénomènes d'effet fondateur. Cependant, leur incidence cumulée est estimée à 50,9 pour 100 000 naissances vivantes, soit la limite de la définition d'une maladie rare<sup>12</sup>. Mais leur prévalence est probablement sous-estimée car elles sont sous-diagnostiquées, du fait de leur rareté et de leur hétérogénéité.

## III. Physiopathologie

### 1. Modes de transmission

Les maladies héréditaires du métabolisme sont des maladies génétiques dont le mode de transmission varie<sup>2</sup> :

- Transmission autosomique récessive : l'écrasante majorité des MHM se transmettent sur un mode autosomique récessif. Ce mode de transmission prédominant explique en partie la variation de la prévalence des MHM dans certaines populations : il existe une prévalence plus importante des MHM à transmission autosomique récessive dans les populations avec un fort taux d'unions consanguines, ainsi qu'une prévalence plus importantes de certaines MHM dans les populations en cas d'effet fondateur (goulot d'étranglement démographique par établissement d'une nouvelle population sur un nouveau territoire ou réduction brusque de la taille d'une population puis expansion). L'aspartylglucosaminurie en Finlande et la maladie de Tay-Sachs dans la population juive ashkénaze sont deux exemples d'effets fondateurs.
- Transmission autosomique dominante : ce mode de transmission est anecdotique dans les MHM. Il est retrouvé dans le déficit en GLUT-1, dans l'hypophosphatasie ou encore dans certaines porphyries. Dans la plupart des cas, les variants hétérozygotes à l'origine de la pathologie sont des variants *de novo*.
- Transmission liée à l'X : les maladies transmises sur ce mode sont les maladies liées à un gène situé sur le chromosome X. Les hommes étant hémizyote, ils ne possèdent qu'un seul allèle porteur de la maladie et sont donc atteints. Ils transmettent l'allèle muté à toutes leurs filles et à aucun de leurs garçons. Les femmes quant à elles possèdent un second chromosome X qui

peut en théorie compenser l'anomalie génétique portée par l'autre allèle. Elles sont souvent appelées « femmes conductrices » car elles ont 50% de risque de transmettre l'allèle muté à leurs enfants, quel que soit leur sexe. On parle également souvent de transmission récessive liée à l'X. Cependant, du fait de l'inactivation aléatoire d'un chromosome X chez les femmes (phénomène de lyonisation), le terme de « récessif » est trompeur. Si certaines femmes porteuses du variant pathogène incriminé sont d'authentiques femmes conductrices, d'autres peuvent présenter des symptômes de manière non exceptionnelle, voire présenter un tableau clinique sévère, équivalent à celui observé chez les hommes. La fréquence des manifestations chez la femme dépend de la physiopathologie de la maladie. Ainsi les cas de filles atteintes de mucopolysaccharidose de type II (ou maladie de Hunter), une maladie systémique liée à un déficit en une enzyme largement excrétée dans le milieu extracellulaire sont anecdotiques, tandis que les formes sévères de déficit en ornithine transcarbamylase, une enzyme indispensable au cycle de l'urée dans le foie, ne sont pas rares chez les filles. D'autres exemples de maladies à transmission liée à l'X sont le déficit en transporteur de la créatine, le déficit en pyruvate déshydrogénase, la maladie de Danon et la maladie de Fabry.

- Transmission maternelle (mode de transmission non mendélien) : ou hérédité mitochondriale. Ce mode de transmission concerne les maladies liées aux variations pathogènes de l'ADN mitochondrial. En effet, les mitochondries, qui contiennent l'ADN mitochondrial, sont transmises presque exclusivement par la mère. Ces pathologies peuvent présenter un large éventail de gravité et affecter de nombreux organes et tissus différents en fonction de la répartition des mitochondries porteuses de l'anomalie. Ce mode de transmission concerne environ 20% des enfants et 80% des adultes atteints de cytopathies mitochondriales. Les autres cytopathies mitochondriales sont liées à des gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales, avec une hérédité mendélienne.

## 2. Protéines impliquées

Les MHM métabolisme impliquent un large éventail de protéines altérées. Voici quelques exemples de type de protéines couramment impliquées dans ces maladies :

- Enzymes : les maladies héréditaires du métabolisme sont souvent causées par des variants génétiques pathogènes qui altèrent la structure ou la fonction des enzymes impliquées dans les voies métaboliques spécifiques. Ces enzymes jouent un rôle crucial dans la conversion des substrats métaboliques en produits finaux. Lorsque ces enzymes sont défectueuses, cela peut

entraîner une accumulation de métabolites toxiques ou une déficience dans la production en aval de métabolites essentiels (**Figure 3**).

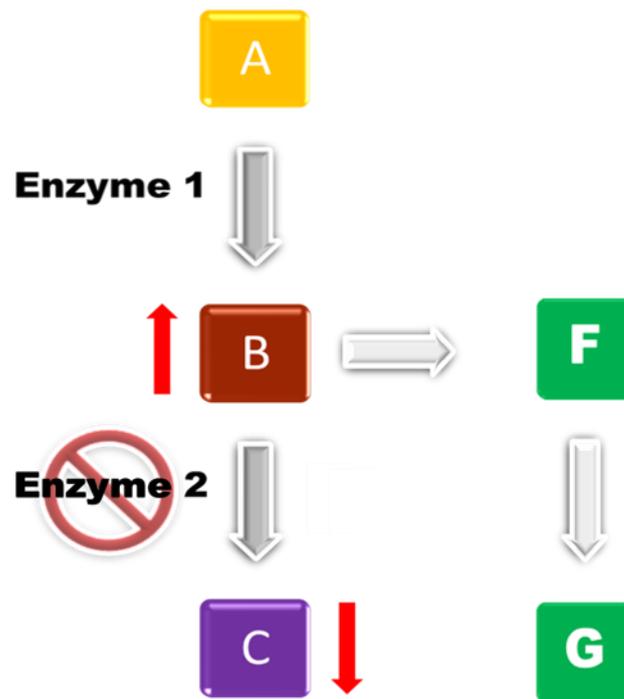


Figure 3. Schéma d'un déficit enzymatique sur une voie métabolique.

Un déficit en enzyme 2 entraîne une accumulation de B qui peut être toxique ou bien donné naissance à des métabolites toxiques par une voie métabolique alternative (F et G). Il existe également un déficit en métabolite C, qui peut accentuer l'accumulation de B par la perte du rétrocontrôle sur l'enzyme 1.

- Transporteurs : certaines MHM sont associées à des altérations des protéines de transport, qui sont responsables du déplacement de molécules à travers les membranes cellulaires. Le déficit d'un transporteur entraîne une accumulation de métabolites dans un compartiment cellulaire donné, ou bien encore un déficit de ces métabolites dans le compartiment cellulaire cible.
- Récepteurs : les récepteurs sont des protéines qui jouent un rôle dans la reconnaissance et la transmission de signaux chimiques dans les cellules. Les MHM peuvent résulter de l'altération de récepteurs impliqués dans la régulation du métabolisme ou du transport des molécules.
- Protéines structurales : certaines MHM sont causées par des variants pathogènes touchant des gènes codant pour des protéines structurales. Ces protéines sont essentielles à l'intégrité et à la fonction normale des organites, des cellules, des tissus et des organes.

Ces exemples illustrent la diversité des types de protéines impliquées dans les MHM et expliquent en partie l'hétérogénéité et la pluralité des pathologies du métabolisme.

#### IV. Présentations cliniques

La présentation clinique des MHM peut varier considérablement en fonction de la voie métabolique spécifique affectée et de la gravité du déficit. Les manifestations peuvent débuter en anténatal, à la naissance, dans l'enfance ou plus tard, voire débuter à un âge avancé, avec une évolution progressive ou par décompensation en fonction du déficit. La sévérité peut dépendre de nombreux facteurs tels que la sévérité du déficit (activité enzymatique effondrée ou résiduelle par exemple), le variant moléculaire, l'environnement (facteurs déclenchants, alimentation...) et des gènes modificateurs avec en fonction des pathologies, une hétérogénéité inter-, voire intrafamiliale<sup>2</sup>.

Un nombre très important de symptômes sont possibles. Certains ne sont pas spécifiques, d'autres sont évocateurs d'une atteinte du métabolisme et enfin d'autres sont pathognomonique d'une MHM spécifique. C'est parfois l'association de différents symptômes, ou associations illégitimes d'atteintes d'organes, qui orientent le diagnostic vers une MHM, en particulier dans le cadre de maladies énergétiques. En effet, le déficit énergétique entraîne des atteintes des organes les plus consommateurs d'énergie, qui peuvent varier en fonction de l'âge du patient. Ainsi, on retrouve communément des atteintes du cerveau, de la rétine, du cœur, du rein, du foie, etc.

De nombreuses MHM sont associées à des symptômes neurologiques, tels que des convulsions, un retard de développement, une déficience intellectuelle et des troubles moteurs. D'autres symptômes peuvent inclure une mauvaise prise alimentaire, un retard de croissance, une atteinte hépatique ou encore une anémie. Certaines MHM peuvent également provoquer des épisodes aigus de crises métaboliques, qui peuvent mettre en danger le pronostic vital en l'absence de prise en charge adaptée. Des exemples de présentations cliniques sont listés dans le **Tableau 2**.

Tableau 2. Exemples de présentations cliniques dans les MHM.<sup>13</sup>

Croissance	Retard de croissance intra-utérin
	Retard de croissance staturo-pondérale
Anomalies neurologiques	Léthargie inexpliquée
	Retard de développement
	Hypotonie
	Dystonie et autres troubles du mouvement
	Convulsions, épilepsie
	Encéphalopathie métabolique
	Démence infantile
	Accidents vasculaires cérébraux
Troubles psychiatriques	Troubles comportementaux et troubles psychiatriques
	Autisme
Troubles gastro-intestinaux	Vomissements récurrents, diarrhée et ictère
	Syndrome de Reye
	Troubles inexpliqués de la fonction hépatique
Analyses biochimiques anormales	Acidose métabolique à trou anionique élevé
	Cétose
	Hypoglycémie
	Hyperlactacidémie
	Hyperammoniémie
Troubles cardiovasculaires	Décompensation métabolique
	Cardiomyopathie
	Arythmies
Troubles squelettiques	Insuffisance cardiaque inexpliquée
	Myopathie
Dysfonctionnement endocrinien	Rhabdomyolyse et myoglobulinurie récurrente
	Hypothyroïdie congénitale et hypoglycémie hyperinsulinémique persistante dans les anomalies congénitales de la glycosylation
	Dysfonction surrénalienne et troubles du développement sexuel dans l'hyperplasie congénitale des surrénales
Autres	Insuffisance surrénalienne primaire dans l'adrénoleucodystrophie
	Episodes aigus à type de sepsis sans germe identifié
	Déficiences auditives et/ou visuelles
	Éruption cutanée et pigmentation anormale
	Dysmorphie et malformations congénitales
	Odeur anormale
	Organomégalie
Mort subite ou antécédents familiaux similaires	
Antécédents maternels de stéatose hépatique aiguë au cours de la grossesse, avec hémolyse, transaminases élevées et thrombopénie (HELLP) et d'avortements spontanés récurrents	

## V. Diagnostic et dépistage

### 1. Le diagnostic des MHM

Un diagnostic précoce d'une MHM est crucial car 70% des MHM sont traitables, permettant ainsi d'améliorer le pronostic vital et/ou fonctionnel des patients. Un diagnostic posé permet également d'établir un pronostic et d'offrir un conseil génétique, voire un diagnostic prénatal.

Les MHM – notamment celles qui sont traitables – devraient être évoquées de manière systématique en cas de difficulté diagnostique. Le bilan est orienté en fonction de la présentation clinique et dans certains cas le traitement peut être mis en place sans attendre les résultats du bilan.

Comme vu ci-dessus, les MHM peuvent affecter tous les organes et systèmes cellulaires, à n'importe quel âge, avec tous les modes de transmission et pouvant avoir une évolution aiguë ou chronique. Quand faut-il donc évoquer une MHM ?

Les éléments évocateurs sont une consanguinité, les antécédents familiaux avec un ou des décès inexplicables dans la famille, un coma inaugural, une association illégitime d'atteintes d'organes, une apparition de signes dans la période néonatale après un intervalle libre (dans le cas des maladies par intoxication) ou au décours d'un facteur déclenchant (infection, jeûne, chirurgie etc.)<sup>2</sup>.

Le diagnostic des MHM repose notamment sur le dosage des métabolites dont la concentration est impactée par le déficit, sur le dosage de l'activité de l'enzyme déficitaire et sur l'analyse génétique permettant d'identifier le défaut moléculaire responsable de la maladie, soit dans le cadre de la confirmation du diagnostic biochimique, soit en première intention (**Figure 4**).

- Phénotypage biochimique : l'analyse biochimique est souvent l'un des premiers outils utilisés pour diagnostiquer les maladies héréditaires du métabolisme. Cela implique la mesure des concentrations de métabolites spécifiques dans des échantillons biologiques tels que le sang, l'urine ou le liquide céphalorachidien. Des techniques comme la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem, la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse ou des méthodes enzymatiques sont utilisées pour identifier et quantifier les métabolites perturbés.
- Analyses fonctionnelles des protéines impliquées : la mesure de l'activité des enzymes spécifiques impliquées dans les voies métaboliques altérées est l'analyse fonctionnelle la plus accessible et la plus facilement réalisée en routine. Ces mesures sont généralement effectuées sur les leucocytes ou taches de sang séché. Elles peuvent également être réalisées sur d'autres

types cellulaires tels que les fibroblastes cutanés. Des techniques telles que les dosages colorimétriques, fluorimétriques ou électrophorétiques et plus récemment la spectrométrie de masse sont utilisées. D'autres analyses fonctionnelles sont disponibles : analyse fonctionnelle des transporteurs ou de complexes protéiques.

- Analyses moléculaires : l'identification de variants pathogènes dans les gènes associés à des MHM peut être réalisée par des techniques de biologie moléculaire. Les techniques de séquençage à haut débit (NGS) sont utilisées dans le cadre du diagnostic du cas index. La taille de cible (panel de gènes, exome, génome) dépendra de l'orientation du bilan clinique, biochimique et fonctionnel. Les techniques de séquençage Sanger, ciblées, sont, quant à elles, utilisées dans le cadre d'une recherche de variant familial (dépistage des apparentés, diagnostic prénatal).

Le diagnostic des MHM nécessite souvent une concertation multidisciplinaire, impliquant la collaboration entre des spécialistes tels que des généticiens, des biochimistes, des pédiatres, des internistes ou des spécialistes d'organes. Les résultats des tests diagnostiques doivent être interprétés dans le contexte clinique global du patient pour parvenir à un diagnostic précis.

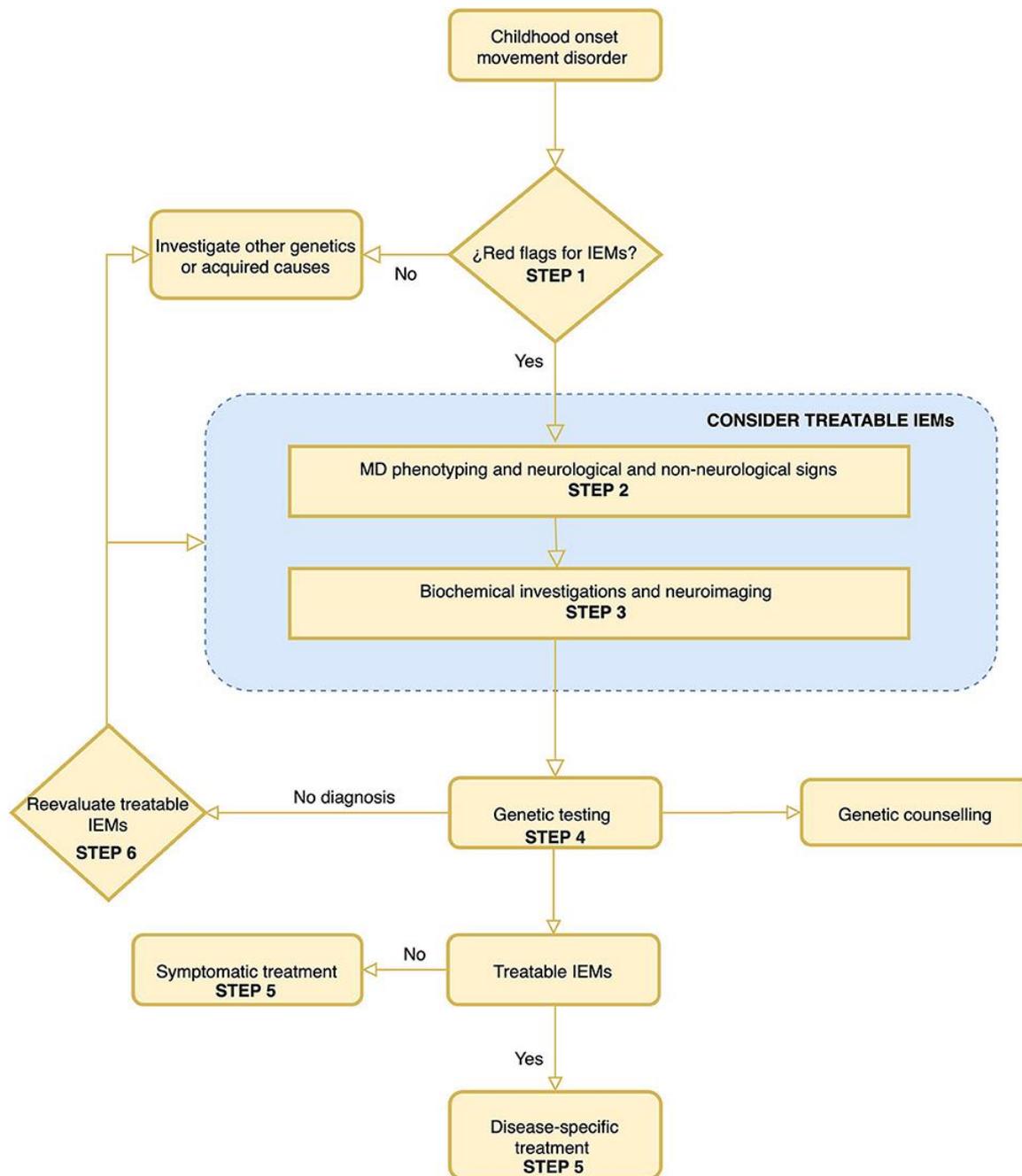


Figure 4. Un exemple d'algorithme pour le diagnostic de MHM dans le cadre de mouvements anormaux à début pédiatrique. Les étapes clés sont l'étape 1 : la recherche de signes évocateurs de MHM, et l'étape 6 : repenser aux MHM traitables. Cela souligne que les MHM traitables doivent toujours être prises en considération.<sup>14</sup>

Au total, le diagnostic des MHM va se baser sur une suspicion clinique avec l'aide du bilan biologique de base (ionogramme sanguin, gaz du sang, lactacidémie, ammoniémie par exemple). Un bilan biochimique spécialisé est ensuite réalisé, souvent de manière séquentielle avec un phénotypage métabolique puis une caractérisation fonctionnelle (par des dosages enzymatiques, par exemple). Vient ensuite le bilan moléculaire orienté par la clinique et le bilan biochimique (**Figure 5A**). Avec les

avancées technologiques, un changement de paradigme s'opère et cette approche classique séquentielle coexiste de plus en plus avec une approche plus globale grâce aux sciences omiques, le but étant toujours de réduire le délai diagnostique (**Figure 5B**).

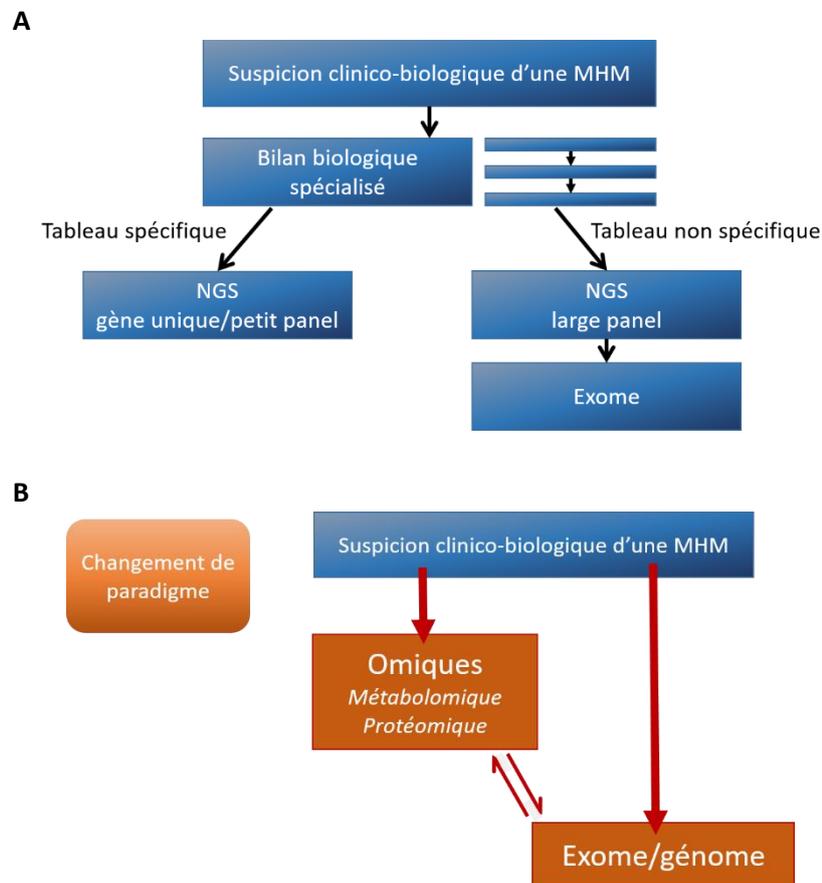


Figure 5. Algorithme diagnostic dans les MHD.

## 2. Le dépistage néonatal

De nombreuses MHD sont incluses dans les programmes de dépistage néonatal dans le monde qui varient d'un pays à un autre. Le dépistage est réalisé sur tache de sang séché sur buvard (papier Guthrie), soit par des dosages de métabolites et/ou d'activités enzymatiques, notamment par spectrométrie de masse, soit par des techniques de biologie moléculaire avec la recherche de variants dans les gènes impliqués dans les MHD. Le but est de détecter des maladies traitables mettant en jeu le pronostic fonctionnel ou vital de l'enfant avant l'apparition des premiers symptômes<sup>13</sup>.

En France, les MHD incluses dans le programme de dépistage néonatal national sont actuellement :

- La phénylcétonurie
- Le déficit en MCAD (medium-chain-acyl-CoA déshydrogénase)
- L'homocystinurie

- La leucinose
- La tyrosinémie de type 1
- L'acidurie isovalérique
- L'acidurie glutarique de type 1
- Le déficit en LCHAD (3-hydroxyacyl-coenzyme A déshydrogénase des acides gras à chaîne longue)
- Le déficit primaire en carnitine
- L'hypothyroïdie congénitale (métabolisme des hormones)
- L'hyperplasie congénitale des surrénales (métabolisme des hormones)

Un nombre croissant de MHM sont intégrées dans les programmes de dépistage néonatal, notamment grâce aux possibilités de multiplexage des analyses et parce que des traitements spécifiques sont disponibles. Cependant, une harmonisation et une mondialisation du dépistage néonatal sont nécessaires. Cet effort d'harmonisation a été amorcé aux Etats-Unis, pays où les programmes de dépistage diffèrent d'un état à un autre : il s'agit de la liste RUSP ou *Recommended Uniform Screening Panel* (<https://www.hrsa.gov/advisory-committees/heritable-disorders/rusp>).

## VI. Traitements

Environ 70% des MHM disposent de thérapies spécifiques<sup>2</sup>. Les options de traitement des MHM dépendent du déficit, de sa gravité et du stade auquel il est diagnostiqué. Plusieurs approches peuvent être utilisées (**Figure 6**), en voici quelques exemples :

- Prise en charge diététique, par régime : de nombreuses MHM peuvent être traitées grâce à un régime strict. Ce régime peut limiter l'apport d'une molécule non métabolisable (par exemple la phénylalanine dans la phénylcétonurie liée au déficit en phénylalanine hydroxylase) ou favoriser les voies métaboliques alternes afin de contourner le bloc métabolique (par exemple les régimes cétoènes, riches en lipides, en cas de déficit du métabolisme des glucides). Des formules ou des compléments alimentaires doivent être utilisés pour fournir une nutrition adéquate.
- L'enzymothérapie substitutive : dans le cadre des MHM dues à un déficit enzymatique, une enzymothérapie substitutive peut être utilisée pour remplacer ou compléter la protéine déficiente. Il s'agit en général de traitements intraveineux devant être répétés à intervalles réguliers.

- Les chaperonnes pharmacologiques : ces molécules permettent de corriger les défauts de repliement des protéines mutées, permettant ainsi leur stabilisation et leur adressage à leur site d'action. Ces traitements ne sont utilisables que lorsqu'une protéine est produite et ne peuvent donc pas être utilisés chez tous les patients puisqu'elles sont inefficaces chez les patients avec variants non-sens par exemple.
- La transplantation de cellules souches hématopoïétiques : dans certaines MHM, notamment un certain nombre de maladies lysosomales, cette approche permet de traiter l'organisme du patient dans son ensemble et notamment le système nerveux central grâce aux propriétés de sécrétion et d'adressage des enzymes lysosomales.
- La thérapie génique : dans de nombreuses MHM, des thérapies géniques *in vivo* ou *ex vivo* sont en développement. Plus récemment, l'approche par édition génique est explorée, notamment grâce aux ciseaux moléculaires CRISPR/Cas9 avec ARN guide qui permettent d'exciser la séquence nucléotidique anormale pour la remplacer par la séquence sauvage.
- Les traitements symptomatiques : ils permettent la prise en charge des complications et constituent des soins de support.

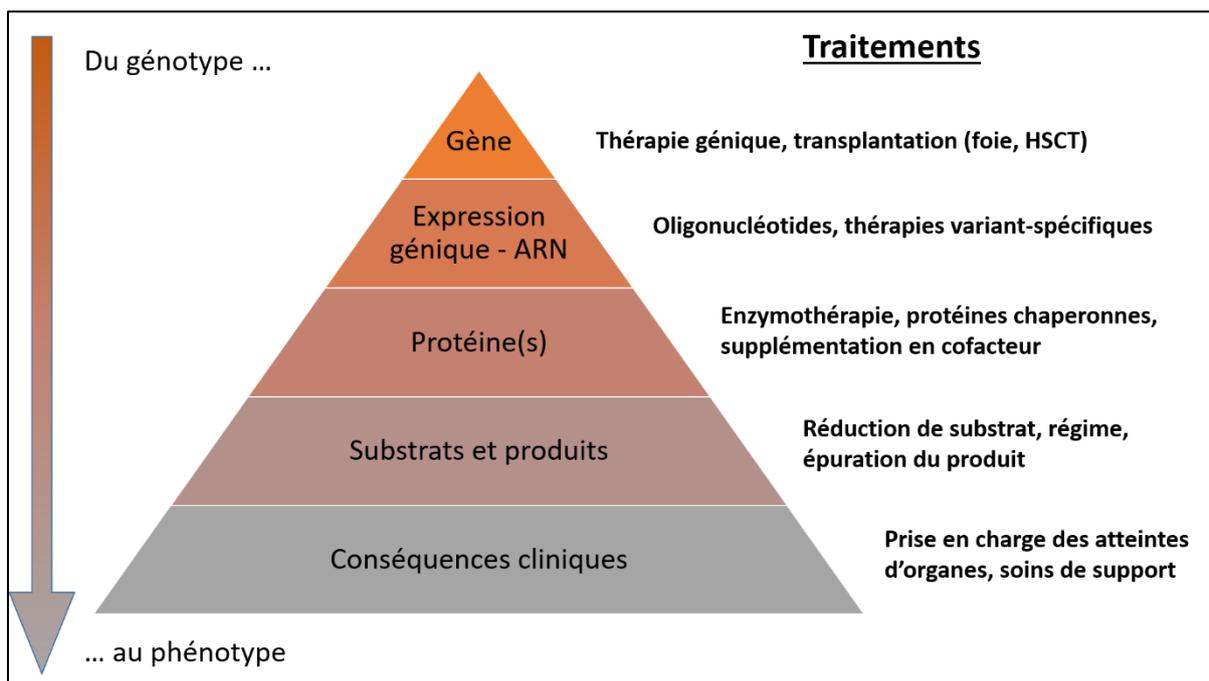


Figure 6. Approches thérapeutiques dans les MHM.

Il convient de noter que même si ces traitements peuvent être efficaces pour prendre en charge les symptômes et prévenir les complications voire éviter les manifestations de la maladie, de nombreuses MHM sont des affections chroniques qui nécessitent une prise en charge et une surveillance à vie. Les

plans de traitement peuvent devoir être ajustés au fil du temps en fonction de l'âge du patient, de l'évolution des symptômes ou des événements intercurrents.

La prise en charge des patients nécessite généralement une approche multidisciplinaire avec l'implication de nombreux spécialistes tels que des généticiens, des diététiciens, des psychologues, des rééducateurs, des pédiatres et/ou des médecins d'adultes formés spécifiquement aux maladies métaboliques ainsi que des spécialistes d'organes en fonction des atteintes. Un diagnostic et un traitement précoces peuvent prévenir ou minimiser les complications de ces troubles et améliorer le pronostic vital, mais aussi fonctionnel, et par conséquent la qualité de vie des patients et de leurs proches.



## CHAPITRE II : Le lysosome

### I. Histoire du lysosome

Le terme « lysosome » provient de lyso-, référant à la lyse, du latin *lysis*, via le grec ancien λύσις, *lúsis* qui veut dire « relâchement », et de -some, du grec σῶμα, *soma*, le « corps », soit le « corps lytique ». Le terme est apparu pour la première fois dans la littérature scientifique en 1955 dans une étude de de Duve sur le fractionnement cellulaire, une technique d'isolement d'organites<sup>15</sup>. Christian de Duve est un médecin et enseignant-chercheur belge né en 1917 et décédé en 2013. Sa découverte du lysosome est le résultat du hasard (sérendipité ou *serendipity* en anglais)<sup>16</sup>.

Au début des années 1950, avec son équipe, il cherche à élucider l'action de l'insuline sur le foie. Il s'intéresse tout d'abord à une enzyme hépatique, alors connue sous le nom d'hexose-phosphatase, qui interférerait avec l'action de l'insuline dans le tissu hépatique isolé. L'équipe parvient à caractériser l'enzyme comme une glucose 6-phosphatase<sup>17</sup>. A la même période, le fractionnement par centrifugation est développé et commence à être utilisé pour étudier la distribution intracellulaire des enzymes, en particulier dans le tissu hépatique<sup>18,19</sup> (**Figure 7**). Quatre fractions sont classiquement séparées : une fraction nucléaire, une fraction à grands granules contenant principalement des mitochondries, une fraction à petits granules nommés microsomes – plus tard identifiés comme des fragments du réticulum endoplasmique – et le surnageant. Il apparaît que la glucose 6-phosphatase est associée aux microsomes et qu'elle semble être étroitement liée aux membranes<sup>20,21</sup>.

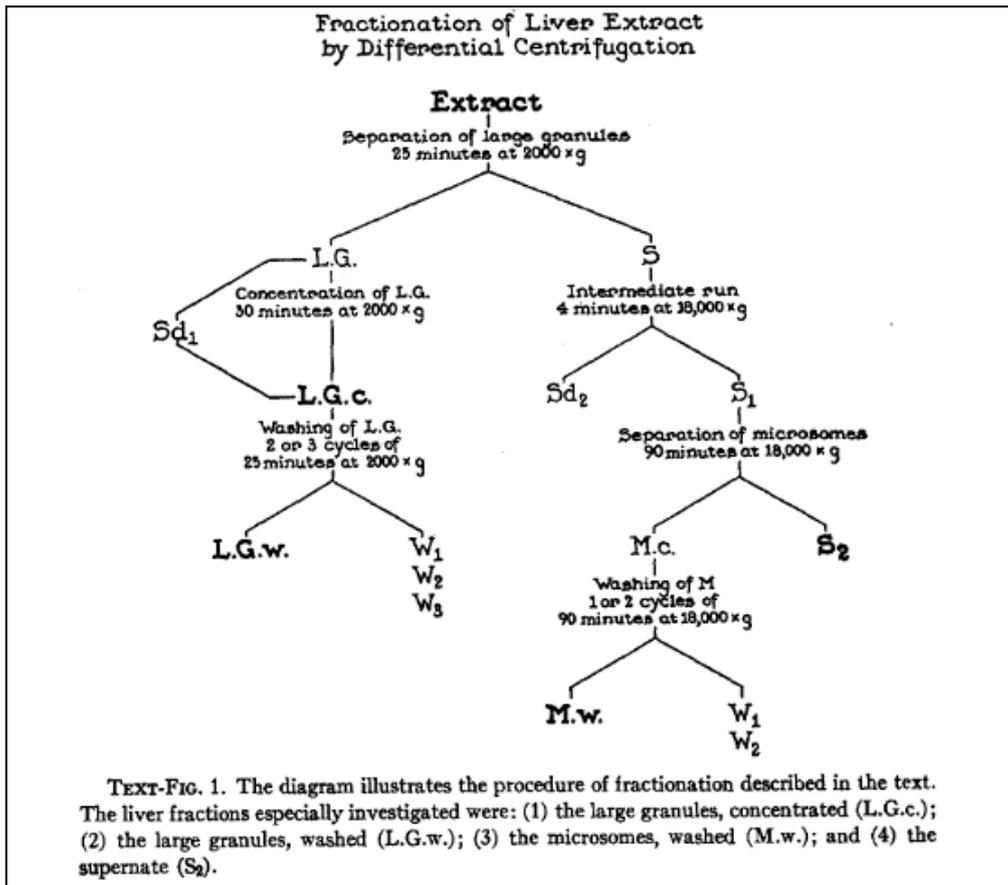


Figure 7. Protocole de fractionnement cellulaire, 1946.<sup>5</sup>

Une partie des études biochimiques réalisées consistait en la distinction et la séparation de la glucose 6-phosphatase d'une autre phosphatase hépatique, la phosphatase acide non spécifique. Pour cela, le dosage de l'activité de la phosphatase acide a été effectué dans les différentes fractions. Étonnamment, il semblait que l'enzyme avait disparu, avec des activités anormalement basses dans l'homogénat ainsi que dans les différentes fractions. De nouveaux dosages des préparations conservées au réfrigérateur cinq jours plus tard montraient des activités enzymatiques revenues à la normale, avec l'augmentation la plus importante dans la fraction mitochondriale<sup>22</sup>. Des expériences d'activation par différents moyens ont apporté la solution : la phosphatase acide serait enveloppée dans des particules limitées par une membrane empêchant à la fois la sortie de l'enzyme et l'entrée du substrat<sup>23</sup>. Toute technique endommageant les membranes supprimait la « latence » de l'enzyme. De plus, l'activité enzymatique était identifiée dans deux fractions différentes : la fraction mitochondriale et la fraction microsomale<sup>24</sup>. Un protocole de centrifugation à cinq fractions a alors permis de séparer la fraction mitochondriale en deux fractions, une fraction riche en mitochondries (M) et une fraction riche en la nouvelle particule (L pour light-mitochondrial).

En 1955, cinq autres enzymes avaient été identifiées dans la fraction L : quatre hydrolases acides – la  $\beta$ -glucuronidase, une cathepsine, une ribonucléase et une désoxyribonucléase – et l'urate oxydase<sup>15</sup>. Les quatre hydrolases partageaient les mêmes propriétés de latence que la phosphatase acide et semblaient être contenues dans les mêmes particules<sup>15,25</sup>. L'urate oxydase sera plus tard associée à une autre nouvelle particule cytoplasmique, le peroxysome<sup>26</sup>. La présence de cinq hydrolases dans la même particule délimitée par une membrane et ayant des substrats différents suggérait une fonction digestive de cette structure. D'où le terme « lysosome ».

Le lysosome ainsi défini biochimiquement est caractérisé morphologiquement par microscopie électronique en 1956<sup>27</sup>. Cette identification est définitivement confirmée en 1965<sup>28</sup>. Christian de Duve obtient le Prix Nobel de physiologie ou médecine en 1974 pour ses découvertes concernant l'organisation structurelle et fonctionnelle de la cellule (**Figure 8**).



*Figure 8. Le Roi de Suède Carl Gustav et Christian de Duve en 1974 à la cérémonie organisée à Stockholm pour les nouveaux lauréats des Prix Nobel.*

## II. Structure et composition

### 1. Introduction

Le lysosome est un organite cellulaire présent dans le cytosol des cellules eucaryotes animales. Cinquante à 1 000 lysosomes sont présents dans chaque cellule, à l'exception des globules rouges<sup>29</sup>. Ce sont des organites hétérogènes, dynamiques, dont la position, la morphologie, la taille et le contenu enzymatique et en substrat varient.

Les lysosomes sont de petites vésicules sphériques 0,2 à 0,5 µm de diamètre délimitées par une membrane lipidique unique formée par la fusion de vésicules dérivées de l'appareil de Golgi et d'autres membranes intracellulaires telles que celles des endosomes (**Figure 9**). Les membranes lysosomales contiennent des centaines de protéines membranaires (protéines faisant partie intégrante de la membrane ou protéines associées à la membrane), y compris divers transporteurs et canaux ioniques.

Le lysosome est le siège de la dégradation des macromolécules. Les produits de cette dégradation peuvent être ensuite recyclés ou excrétés par la cellule : protéines, acides nucléiques, carbohydrates, lipides, etc. L'acidification de la lumière lysosomale est assurée et maintenue par la V-ATPase lysosomale qui permet l'internalisation de protons. Un pH bas compris entre 4,5 et 5,5 permet l'activation de plus de 50 hydrolases intra-lysosomales qui permettent la digestion des macromolécules.

Alors que les 50 premières années de recherche sur les lysosomes se sont principalement concentrées sur la compréhension de leur capacité lytique, les dernières années se sont concentrées sur la compréhension de la membrane et de la communication des lysosomes avec le reste de la cellule. Ces recherches ont replacé les lysosomes au centre de la régulation métabolique de l'homéostasie cellulaire, bien au-delà de leur fonction initialement supposée purement de dégradation en tant que « poubelle cellulaire » ou « usine de recyclage de la cellule ».

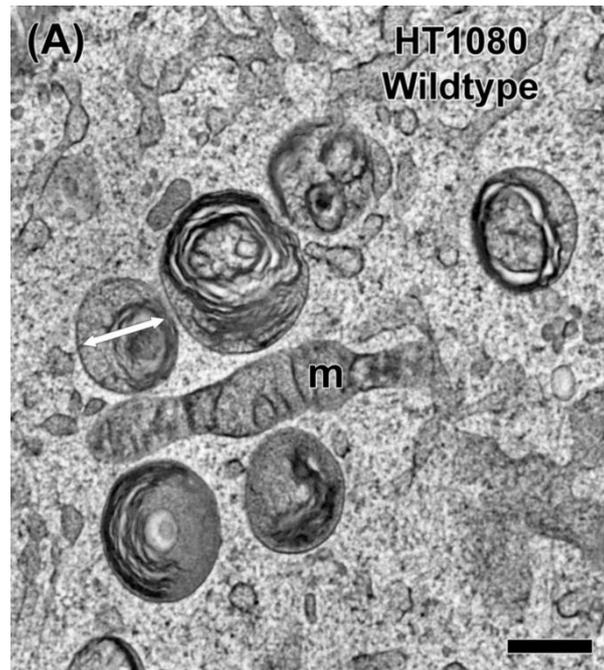


Figure 9. Lysosomes en microscopie électronique.  
Lignée de cellules humaines de fibrosarcome HT-1080. Le diamètre des lysosomes est en moyenne de 400 nm (double flèche blanche). m : mitochondrie. Barre d'échelle : 400 nm. D'après <sup>30</sup>.

## 2. Composition de la membrane lysosomale

Des études protéomiques ont identifié plus de 700 protéines membranaires lysosomales, soit en tant que protéines essentiellement lysosomales (« protéines résidentes de la membrane lysosomale »), soit en tant que protéines avec une localisation secondaire et un enrichissement dans les lysosomes<sup>31-33</sup>. Pour un grand nombre de ces protéines membranaires, la fonction moléculaire n'a pas encore été élucidée.

La membrane lysosomale dite « limitante » permet la séparation entre la lumière acide du lysosome et le cytosol. Cette membrane diffère par plusieurs aspects des autres endomembranes. Elle a une composition caractéristique en lipides et se caractérise par un degré élevé de protéines hautement N-glycosylées<sup>34</sup>.

Les membranes lysosomales sont riches en sphingomyéline et contiennent un lipide rare chargé négativement, le bis(monoacylglycéro)phosphate (BMP) qui est absent des autres membranes cellulaires et peut être utilisé comme marqueur<sup>35,36</sup>. Le cholestérol n'est pas enrichi dans les membranes lysosomales limitantes par rapport aux autres membranes cellulaires<sup>35,37</sup> (**Figure 10**).

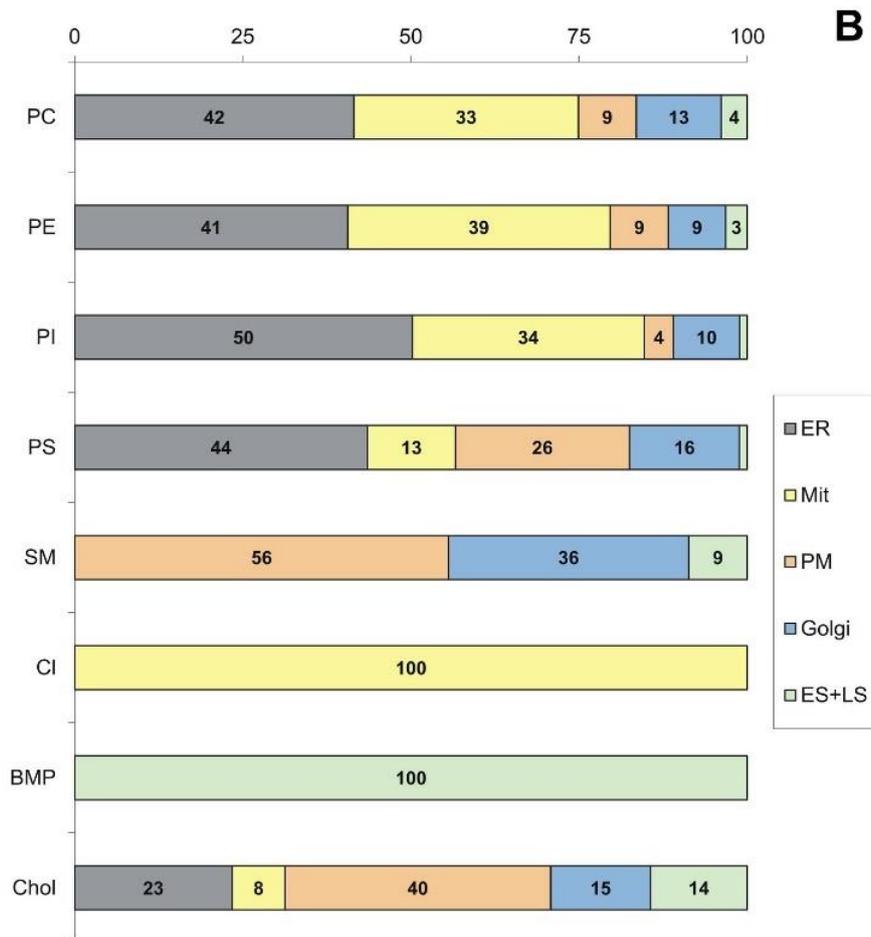


Figure 10. Composition lipidique des membranes biologiques.

Distribution des lipides entre les compartiments subcellulaires exprimée en mol% de la quantité totale d'une classe de lipides donnée dans la cellule entière. ER : réticulum endoplasmique ; Mit : mitochondries ; PM : membrane plasmique ; ES + LS : endosomes et lysosomes ; PC : phosphatidylcholine ; PE : phosphatidyléthanolamine ; PI : phosphatidylinositol : phosphatidylsérine ; SM : sphingomyéline ; CI, cardiolipine (diphosphatidylglycérol) ; BMP : bis(monoacylglycéro)phosphate ; Chol : cholestérol.<sup>37</sup>

Les lysosomes contiennent des phosphoinositides (PIP), qui définissent le système endomembranaire. Le phosphatidylinositol 3-phosphate (PI<sub>(3)</sub>P) est le principal PIP du système endosomal, mais il a également été démontré que les lysosomes contiennent du phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate (PI<sub>(3,5)</sub>P<sub>2</sub>) et du phosphatidylinositol 5-phosphate (PI<sub>(5)</sub>P)<sup>38</sup>. Ces PIP spécifiques aux lysosomes interviennent dans le positionnement et la dynamique des lysosomes, les événements de fusion, la reformation des lysosomes après fusion avec des autophagosomes et la signalisation par le complexe mTOR (*mammalian target of rapamycin*, mTORC1)<sup>38</sup>. mTORC1 est un régulateur central de la croissance et de la prolifération cellulaire<sup>39,40</sup>.

La membrane lysosomale enferme une lumière contenant des concentrations élevées d'enzymes lytiques. Un système sophistiqué de protéines membranaires permettant l'échange de métabolites

entre le lysosome et le cytoplasme est donc nécessaire. Les transporteurs permettent essentiellement l'exportation des produits finaux du catabolisme issus de l'hydrolyse lysosomale, mais il semblerait qu'il existe également un flux entrant de métabolites et que les lysosomes pourraient avoir un rôle de stockage, au même titre que la vacuole de la levure et des plantes<sup>41,42</sup>.

#### Principales protéines structurales :

**Protéines LAMP-1 et LAMP-2 :** *Lysosome associated protein-1* (LAMP-1) et -2 (LAMP-2) sont des composants protéiques majeurs de la membrane lysosomale<sup>43</sup>. Il s'agit de protéines transmembranaires avec un long domaine luminal, un seul domaine transmembranaire et une extrémité C-terminale cytoplasmique. Les deux protéines ont une séquence peptidique avec environ 57% d'homologie<sup>44</sup>. Elles sont glycosylées, avec une N- et une O-glycosylation. LAMP-1 et LAMP-2 représentent environ 50% des protéines de la membrane lysosomale, et sont des marqueurs du compartiment lysosomal<sup>45</sup>.

Des études d'inactivation (*knock-out*, KO) de chaque protéine et de double KO sur un modèle murin ont permis de montrer que ces protéines partagent des fonctions communes *in vivo*<sup>43</sup>. Les souris KO pour le gène *LAMP2* présentent un phénotype sévère avec accumulation d'autophagosomes dans de nombreux tissus associée à une diminution de la dégradation par autophagie. Les souris déficientes pour le gène *LAMP1* sont viables et ne présentent qu'une astroglie modérée, avec une surexpression de LAMP-2 dans plusieurs tissus. Les doubles-KO ne sont quant à elles pas viables. Les protéines LAMP remplissent des fonctions bien au-delà du maintien de l'intégrité structurelle des membranes lysosomales, avec un rôle dans l'autophagie et le métabolisme du cholestérol<sup>43,46</sup>.

**Protéine LIMP-2 :** *Lysosomal Integral Membrane Protein 2* (LIMP-2), aussi appelée SCARB2 (*Scavenger Receptor B2*) est un membre de la superfamille des récepteurs éboueurs (*scavengers*). Il s'agit d'une protéine transmembranaire qui possède deux domaines transmembranaires. La majorité de la protéine est luminale et est fortement glycosylée. LIMP2 fonctionne comme un récepteur pour le transport de l'enzyme  $\beta$ -glucocérébrosidase vers les lysosomes<sup>47</sup>, une hydrolase lysosomale qui catalyse la dégradation du glucocérébroside en glucose et céramide. Les variants pathogènes dans le gène *GBA* codant la  $\beta$ -glucocérébrosidase sont à l'origine de la maladie de Gaucher, tandis que les variants pathogènes du gène *LIMP2* entraînent une forme d'épilepsie myoclonique progressive dont plusieurs symptômes se recoupent avec ceux de la maladie de Gaucher<sup>48</sup>. Sous sa forme dimérique, LIMP-2 s'associe à des lipides, dont notamment le cholestérol, la phosphatidylcholine et la phosphatidylsérine<sup>49</sup>. LIMP-2 semble jouer un rôle dans l'incorporation de phosphatidylsérine dans les membranes intracellulaires<sup>49</sup>.

## La N-glycosylation des protéines de la membrane lysosomale

Les N-glycanes empêchent les endo- et exoprotéases intra-lysosomales d'accéder directement aux liaisons peptidiques. La somme de cette couche dense de protéines glycosylées, composée en grande partie des abondantes protéines structurales LAMP-1 et LAMP-2, forme une couche superficielle de type « glycocalyx » tapissant le côté luminal de la membrane lysosomale<sup>43,44</sup>. Le halo glycosylé luminal a une épaisseur d'environ 8 nm ce qui correspond à peu près à l'épaisseur d'une bicouche phospholipidique, se différenciant des glycocalyx « classiques », comme celui des cellules endothéliales, qui sont 50 à 100 fois plus épais<sup>50,51</sup>. Ce halo glycosylé luminal est principalement composé de chaînes courtes, N- et rarement O-glycanes<sup>52</sup>. Les protéines LAMP contiennent en outre des hydrates de carbone polylactosamine N-liés, des structures allongées de glycane avec des répétitions terminales de galactose et de N-acétylglucosamine<sup>52</sup>.

Les glycolipides en abondance participent également à la formation du halo glycosylé : glycosphingolipides, gangliosides, etc<sup>50,53</sup>.

## Le transport des acides aminés (AA) :

Un grand nombre de transporteurs ont été identifiés.

PQLC2 transporte les acides aminés chargés positivement (AA cationiques), notamment l'ornithine, l'arginine, l'histidine et la lysine<sup>54</sup>. Les petits acides aminés neutres, y compris la proline, la glycine et l'alanine sont transportés par LYAAT1 (aussi appelé PAT1 ou SLC36A1)<sup>55,56</sup>. SNAT7 (aussi appelé SLC38A7) a été identifié comme le principal transporteur lysosomal de la glutamine et de l'asparagine, des acides aminés polaires non chargés<sup>57</sup>. SNAT7 reconnaît également l'alanine et l'arginine, mais il n'a pas pu être montré que ces AA étaient transportés par SNAT7 en conditions de pH lysosomal physiologique<sup>57,58</sup>. SLC15A4 (aussi appelé PHT1) a été décrit comme un transporteur de l'histidine<sup>59</sup>. Les transporteurs des acides aminés polaires non chargés comme la sérine et la thréonine, des acides aminés avec des chaînes latérales hydrophobes comme la méthionine et la valine, et des acides aminés avec des chaînes latérales hydrophobes volumineuses comme le tryptophane, la phénylalanine et la tyrosine ne sont pas connus (**Figure 11A**). Ces transporteurs ont été décrits biochimiquement, mais n'ont pas été clonés et leurs gènes codants n'ont pas été identifiés<sup>60-62</sup>. Des développements récents de méthode tels que l'isolement rapide des lysosomes à partir de cellules en culture (« LysolIP »), les améliorations récentes des approches métabolomiques ciblées et non ciblées, et l'utilisation de

l'approche CRISPR/Cas9 pour le knock-out de gènes candidats pourraient aider à l'identification de ces transporteurs<sup>63</sup>.

Les peptides ne sont pas nécessairement dégradés en acides aminés uniques au sein du lysosome. Des transporteurs d'oligopeptides et de dipeptides lysosomaux sont décrits, avec certains dipeptides qui seraient résistants à la protéolyse lysosomale. Une activité hydrolase dirigée contre les dipeptides essentiellement cytoplasmique a été décrite<sup>64,65</sup>.

Le transport des peptides à travers la membrane lysosomale n'est pas exclusivement à sens unique : dans le cas particulier des cellules immunitaires présentatrices d'antigène, le transporteur d'oligopeptides ABCB9/TAPL importe des peptides cytosoliques allant de 6 à 59 acides aminés dans la lumière lysosomale, avec comme substrat préférentiel les peptides avec des résidus N- et C-terminaux hydrophobes chargés positivement ou de grande taille<sup>66</sup>.

#### Le transport des monosaccharides

Les monosaccharides dérivés de l'action catabolique des glycosidases acides agissant sur le glycogène, les glycolipides, les glycoprotéines et les mucopolysaccharidoses constituent une quantité substantielle des produits finaux cataboliques de l'hydrolyse lysosomale<sup>67</sup>.

Ceux-ci comprennent principalement des hexoses neutres comme le glucose, le mannose, le fucose et le galactose, mais aussi des monosaccharides anioniques chargés comme l'acide sialique, l'acide iduronique, l'acide glucuronique (tous deux dérivés de la dégradation des mucopolysaccharides) et des dérivés amides du glucose et du galactose (N-acétylglucosamine et N-acétylgalactosamine respectivement)<sup>67</sup>.

Chacun des groupes de monosaccharides biochimiquement distincts possède son transporteur (**Figure 11B**). Le ou les transporteurs du groupe majeur de monosaccharides, les hexoses neutres, ne sont pas connus. Le transport des hexoses dans la cellule est médié par 14 isoformes de la famille des protéines de transport du glucose (GLUT), mais seul GLUT8 (codé par *SLC2A8*) a été retrouvé dans les lysosomes<sup>68,69</sup>. Cependant, GLUT8 n'est exprimé que dans certains tissus et les souris knock-out *GLUT8/Slc2a8* sont viables, se développent normalement et ne présentent que de légères altérations cérébrales, cardiaques et des spermatozoïdes<sup>69,70</sup>. Cela contraste avec les phénotypes sévères causés par déficit de la dégradation enzymatique du glycogène lysosomal dans le cas d'un déficit en glucosidase acide lysosomale (maladie de Pompe)<sup>71</sup>. Ainsi, GLUT8 n'est probablement pas l'unique transporteur lysosomal d'hexoses neutres.

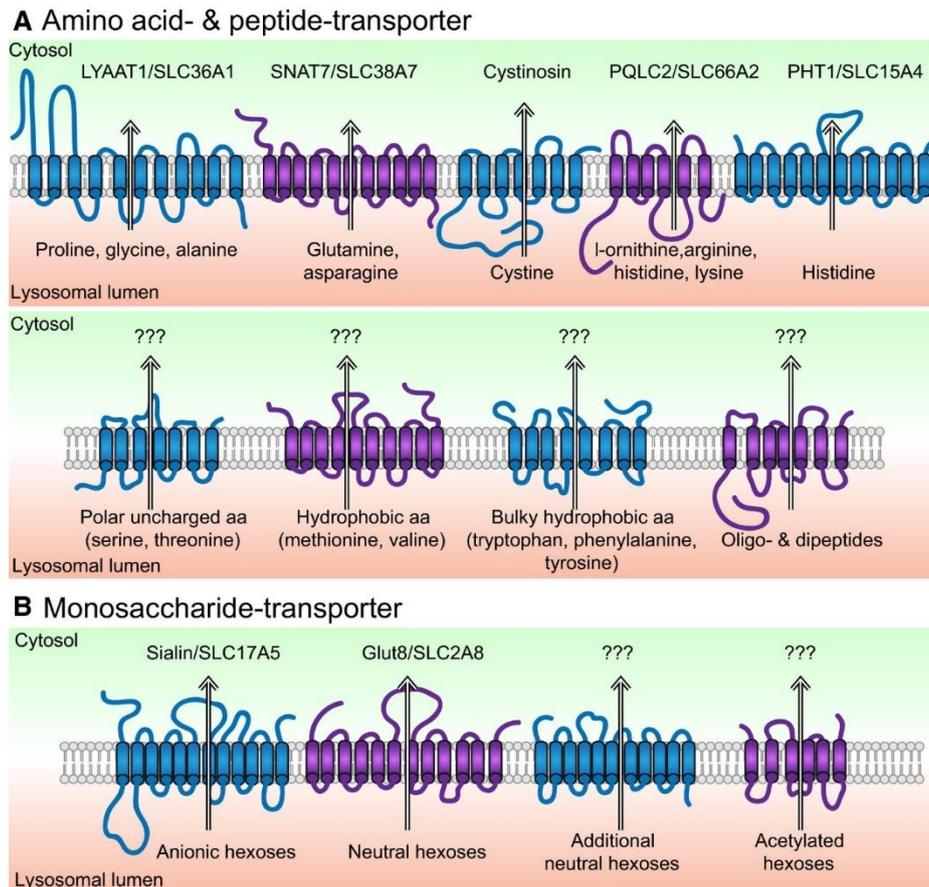


Figure 11. Vue d'ensemble schématique des transporteurs lysosomaux pour (A) les acides aminés et (B) les monosaccharides.

### 3. Les enzymes lysosomales

Les enzymes lysosomales sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique puis transportées vers l'appareil de Golgi, où elles sont conditionnées dans des vésicules qui sont ensuite transportées vers le lysosome. Une fois à l'intérieur du lysosome, les enzymes sont activées par clivage protéolytique<sup>72</sup>.

Les lysosomes sont riches en enzymes hydrolytiques telles que les protéases, les sulfatases, les lipases, les phosphatases, les glycosidases et les nucléases, qui dégradent toutes les macromolécules complexes. Les enzymes lysosomales ont une activité optimale à pH 5.

#### Les phosphatases

- Phosphatase acide : phosphomonoesters
- Phosphodiesterase acide : oligonucléotides and phosphodiesters

### Les nucléases

- Ribonucléase acide : ARN
- Désoxyribonucléase acide : ADN

Elles dégradent l'ARN et l'ADN délivrés au lysosome via un processus appelé RNautophagy/DNautophagy (RDA)<sup>73</sup>. La protéine membranaire lysosomale LAMP-2 facilite la translocation des acides nucléiques vers le lysosome (ARN<sup>74</sup> et ADN<sup>75</sup>).

### Enzymes hydrolysant les polysaccharides ou les mucopolysaccharides

- $\beta$ -galactosidase : galactosides
- $\alpha$ -glucosidase : glycogène
- $\alpha$ -mannosidase : mannosides, glycoprotéines
- $\beta$ -glucuronidase : polysaccharides, mucopolysaccharides
- Lysozymes : parois des bactéries, mucopolysaccharides
- Hyaluronidase : acide hyaluronique, chondroïtine sulfate
- Arylsulfatase : sulfates

### Protéases

- Cathepsines : il s'agit de protéases classifiées en fonction du résidu présent au niveau du site catalytique (sérine, aspartate, cystéine). Les protéases sont essentielles dans les processus de protéolyse, les modifications post-traductionnelles des protéines et la dégradation des lipoprotéines de basse densité (LDL)<sup>76,77</sup>. Les cathepsines jouent un rôle dans la pathogenèse des valvulopathies liées à l'athérosclérose<sup>78-80</sup> ; dans la maturation du système nerveux central au cours de la période postnatale<sup>81</sup> ; dans les voies de signalisation intracellulaires en influençant la dégradation des facteurs de croissance médiée par les récepteurs comme l'insuline<sup>82</sup> et IGF<sup>83</sup> ; dans la régulation de la macroautophagie et le maintien de l'intégrité de la structure lysosomale<sup>84</sup>.
- Collagénase : collagène
- Peptidase : peptides

## Enzymes dégradant les lipides

- Estérase : esters d'acyl gras
- Phospholipase : phospholipides
- La lipase acide lysosomale (LAL) : la LAL joue un rôle critique dans le métabolisme énergétique, la signalisation et l'intégrité structurelle des membranes cellulaires<sup>85</sup>. Elle est responsable de l'hydrolyse des esters de cholestérol des lipoprotéines et des triglycérides (TG) en cholestérol libre et en acides gras (AG), respectivement. La LAL hydrolyse les lipides neutres, qui sont principalement délivrés au lysosome soit par endocytose des lipoprotéines, soit par autophagie (également appelée lipophagie)<sup>86</sup>. Dans des conditions physiologiques, la LAL hydrolyse les esters de cholestérol contenant des LDL acétylés en cholestérol libre, qui peuvent être principalement stockés sous forme de gouttelettes lipidiques ou utilisées pour l'assemblage de la membrane. Les LDL oxydées sont un mauvais substrat pour la LAL, provoquant la rétention des esters de cholestérol et du cholestérol libre dans le lysosome des cellules spumeuses favorisant l'athérogenèse<sup>87</sup> (**Figure 12**).

L'hydrolyse des TG libère des AG libres, qui sont essentiels à l'activation des macrophages et à la résistance à l'infection<sup>88</sup>. La LAL et ses médiateurs lipidiques semblent essentiels à la maturation et au fonctionnement des cellules immunitaires en jouant un rôle clé dans la différenciation et le métabolisme cellulaires.

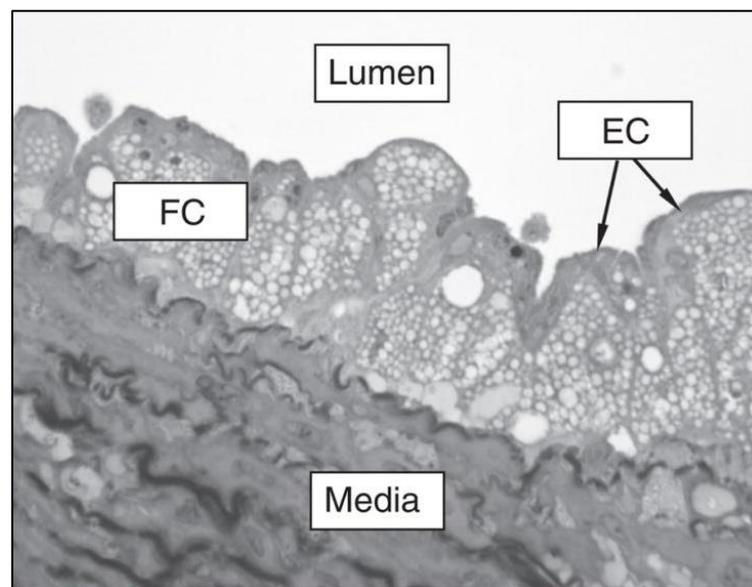


Figure 12. Lésion d'athérosclérose précoce dans l'aorte d'un pigeon de Carneau blanc en photomicrographie. La plaque d'athérosclérose remplit l'intima de l'artère qui est épaissie. Elle est principalement constituée de cellules spumeuses qui sont des macrophages gorgés de cholestérol identifiables par leur contenu fait de nombreuses gouttelettes lipidiques. La plaque repose sur la média artérielle composée de cellules musculaires lisses et de tissu conjonctif élastique. FC : cellules spumeuses (foam cells) ; EC : cellules endothéliales.<sup>87</sup>

## Sulfatases

Il s'agit d'une famille d'enzymes conservées au cours de l'évolution et classées en sulfatases non lysosomales et lysosomales en fonction de leur localisation subcellulaire et du pH optimal pour leur activité<sup>89,90</sup>. Les sulfatases catalysent l'hydrolyse des glycosaminoglycanes, dont l'héparane-, le dermatane- et le kératane sulfate, les sulfolipides (cérébroside-3-sulfate) et les hormones sulfatées (déhydroépiandrostérone-3-sulfate) qui jouent un rôle essentiel dans la signalisation intracellulaire et la fonction hormonale.

- Arylsulfatase : esters de O- et N-sulfates
- Glucosamine (N-acétyl)-6-sulfatase : mucopolysaccharides
- Iduronate 2-sulfatase : esters de O- et N-sulfates

## 4. Adressage des protéines au lysosome

Les précurseurs d'enzymes lysosomales sont biosynthétisés dans le réticulum endoplasmique rugueux et modifiés dans l'appareil de Golgi<sup>91</sup>.

Les hydrolases lysosomales sont adressées au lysosome majoritairement via la voie des récepteurs au mannose-6-phosphate (M6P). Les enzymes nouvellement synthétisées subissent une modification post-traductionnelle dans l'appareil de Golgi consistant en l'ajout de M6P sur des résidus glycosylés. La première étape est catalysée par la N-acetylglucosamine-1-phosphotransférase, un complexe hexamérique dont les sous-unités sont codées par les gènes *GNPTAB* et *GNPTG*, impliqués dans les mucopolysaccharidoses de type II et III. Les récepteurs au M6P (M6PR) sont présents dans la membrane du Golgi et se lient aux hydrolases ainsi marquées, les séquestrent dans des vésicules couvertes de clathrines (*clathrin-coated vesicles*, CCV) et les transportent depuis le réseau *trans*-Golgi jusqu'aux compartiments endocytaires où elles sont acheminées. Les récepteurs au M6P sont présents dans le *trans*-Golgi, sur les endosomes précoces et tardifs et sur la membrane plasmique, mais sont en revanche absents des lysosomes<sup>92</sup>. Le tri commence par le bourgeonnement et la fusion des CCV entre elles ou avec des endosomes précoces (*early endosomes*, EE) préexistants pour délivrer et trier la cargaison endocytaire<sup>93</sup>.

Ces M6PR sont recyclés dans des vésicules au niveau des endosomes tardifs où le pH acide permet leur dissociation des protéines lysosomales auxquelles ils étaient liés. Les M6PR non liés sont soit transportés des endosomes vers le réseau *trans*-golgien (*trans-golgi network*, TGN) via des vacuoles endosomales, soit recyclés via des endosomes de tri tubulaire (*tubular-sorting endosomes*, EST)<sup>94,95</sup>.

Cette récupération rétrograde des M6PR de l'endosome au TGN se produit via un « rétromère », une structure à cinq sous-unités. Les protéines G monomériques comme les RAB GTPases, telles que Rab5 et Rab7, régulent l'association des rétromères avec les EE<sup>96</sup> (**Figure 13**).

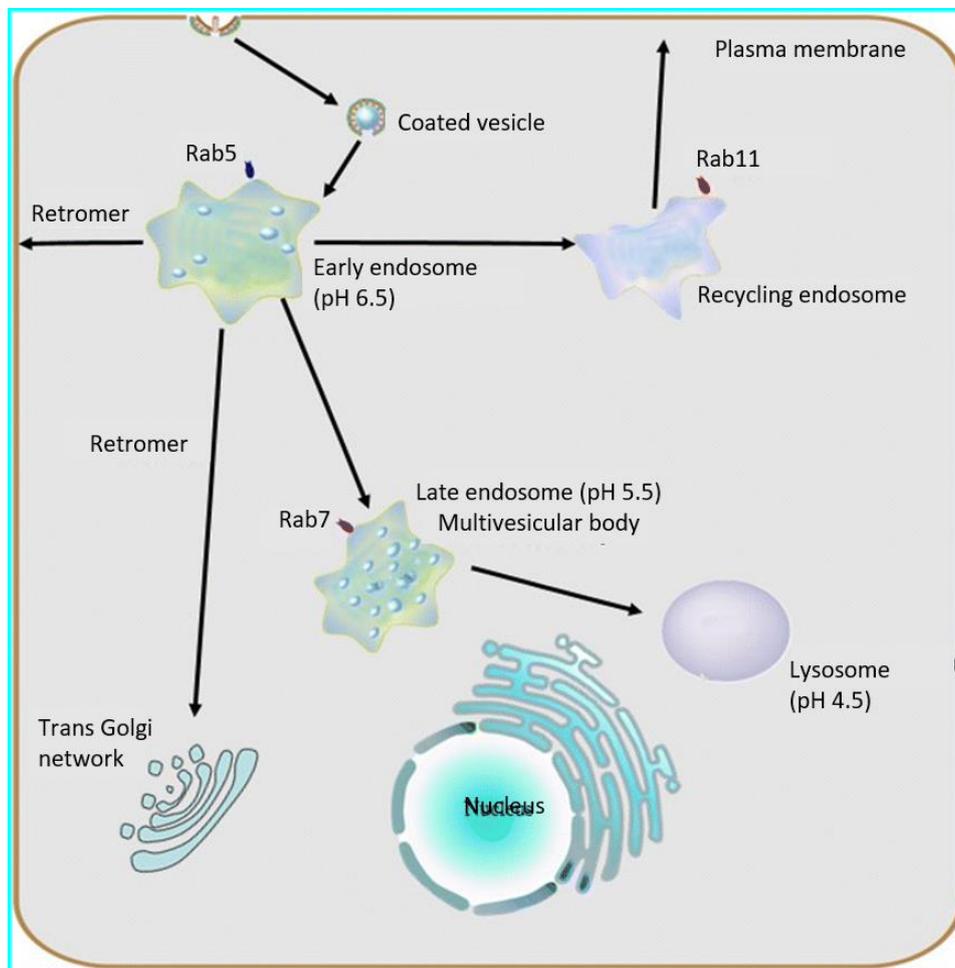


Figure 13. Endocytose et maturation endosomale.

L'internalisation des protéines dépend le plus souvent d'un mécanisme médié par la clathrine. Après internalisation, les protéines sont transportées vers les endosomes précoces par l'intermédiaire de vésicules d'endocytose sous le contrôle de Rab5. Les endosomes précoces sont des stations de tri : les protéines peuvent être recyclées à la surface de la cellule, renvoyées dans le réseau trans-golgien via un rétromère (voie rétrograde) ou dégradées par un ciblage vers le lysosome. un gradient de pH stable est établi dans les différents compartiments au cours du processus de maturation : les endosomes précoces maintiennent un pH d'environ 6,5, les endosomes tardifs d'environ 5,5 et les lysosomes d'environ 4,5.<sup>97</sup>

D'autres voies alternatives d'acheminement existent comme celles de la sortiline, un récepteur chargé de l'acheminement de la prosaposine (PSAP), ou encore celle acheminant la  $\beta$ -glucocérébrosidase via le récepteur LIMP2 comme mentionné plus haut (voir 2).

Les protéines de la membrane lysosomale sont délivrées soit directement aux endosomes et aux lysosomes (voie directe), soit indirectement à la membrane plasmique puis aux endosomes et aux lysosomes (voie indirecte ou de récupération)<sup>98</sup>.

### III. Biologie du lysosome

#### 1. Biogenèse du lysosome

La biogénèse lysosomale est l'un des mécanismes phares de l'adaptation lysosomale. Elle permet d'augmenter le nombre de lysosomes afin de répondre aux besoins de la cellule, dans le cas de l'autophagie induite par la privation de nutriments ou encore pour la distribution des lysosomes aux cellules filles lors de la division cellulaire.

Le transport des EE aux endosomes tardifs (*late endosomes*, LE) implique un tri pour faciliter le mouvement de la « cargaison » vers le lysosome via les MVB et les ILV (**Figure 14**).

Les protéines cargo destinées à la dégradation sont ubiquitinées et reconnues par le complexe ESCRT (complexes de tri endosomaux nécessaires au transport, *endosomal sorting complexes required for transport*). Le transport vésiculaire et la maturation des EE en LE dépendent de la conversion de Rab5 en Rab7. Au fur et à mesure que les EE mûrissent et s'acidifient en LE, ils se déplacent de la périphérie cellulaire au centre de la cellule. Au cours de la maturation, les EE perdent Rab5 sur leur membrane et gagnent Rab7<sup>99</sup>.

De plus, la maturation des EE en LE/lysosomes nécessite la V-ATPase, la pompe à protons qui acidifie les LE/lysosomes à un pH de  $\approx 5,5/5,0$ .

En plus de l'homéostasie des protons, l'équilibre ionique du  $\text{Ca}^{2+}$  dans les LE et les lysosomes est indispensable pour les fonctions endo-lysosomales, y compris le découplage récepteur-ligand et le transport et l'activité des enzymes lysosomales. En effet, la fusion homotypique (fusion des endosomes précoces et tardifs) et hétérotypique (fusion des LE et des lysosomes) dépend du complexe  $\text{Ca}^{2+}$ -calmoduline<sup>100</sup> (voir ci-dessous).

Les lysosomes primaires proviennent de l'appareil de Golgi. Plusieurs modèles de formation du lysosome sont décrits dans la littérature<sup>101,102</sup> (**Figure 14**) :

- Le premier modèle décrit la formation d'EE à partir de la membrane plasmique et leur maturation progressive en LE et en lysosomes.
- Le second modèle implique le transport vésiculaire. Dans ce modèle, des vésicules endosomales (*endosomal carrier vesicle/multivesicular bodies* ou ECV/MVBs) transportant des vésicules intraluminales (*intraluminal vesicles*, ILVs) transfèrent la cargaison des endosomes

précoces aux endosomes tardifs vers les lysosomes ou directement des endosomes tardifs arrivés à maturité vers les lysosomes.

- Le troisième modèle correspond à un événement « *kiss and run* » (s'embrasser et s'enfuir) au cours duquel les endosomes tardifs entrent en contact (« *kiss* ») avec des lysosomes, transférant leur cargaison avec par la suite une dissociation (« *run* ») de l'endosome tardif et du lysosome.
- Le quatrième modèle est présenté comme un événement de fusion-fission impliquant une fusion hétérotypique des endosomes tardifs et des lysosomes pour former des organites hybrides, suivi d'une reformation des lysosomes.

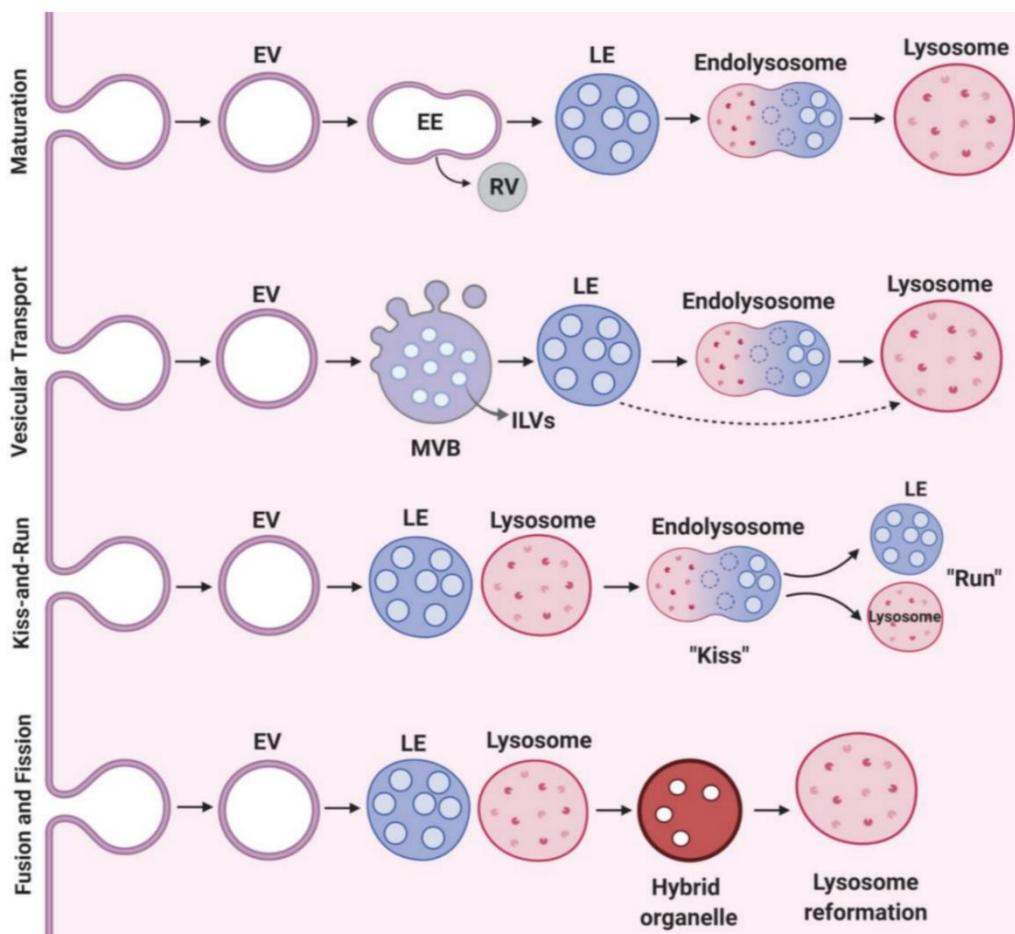


Figure 14. Événements moléculaires au cours des différents modèles de la biogenèse des lysosomes.

EV : vésicules endocytiques ; EE : endosomes précoces ; RV : vésicules de recyclage dérivées du réseau trans Golgi ; LE : endosomes tardifs, MVB : corps multivésiculaires ; ILV : vésicules intraluminales.<sup>72</sup>

## 2. Fonctionnement du lysosome

### a) Localisation et mouvement lysosomal

Le déplacement intracytoplasmique du lysosome est essentiel pour l'exécution de processus tels que la biogenèse du lysosome, les réactions métaboliques assurant l'homéostasie cellulaire, mais également le contrôle de la qualité des protéines. L'altération de l'acidification lysosomale, la formation d'agrégats de protéines mal repliées et l'état des nutriments cellulaires peuvent perturber le positionnement et la motilité des lysosomes<sup>103-106</sup>. A l'état nourri, les lysosomes sont localisés en périphérie, alors qu'après l'épuisement des nutriments, les lysosomes migrent vers les régions périnucléaires pour faciliter la fusion autophagosome-lysosome. La mobilisation des lysosomes de la périphérie cellulaire vers la région périnucléaire est appelée « mouvement rétrograde », tandis que le mouvement des lysosomes de la zone périnucléaire vers la périphérie cellulaire est appelé « mouvement antérograde »<sup>107,108</sup>.

L'acidification intraluminal du lysosome dépend de la localisation intracellulaire et du mouvement du lysosome<sup>104,109</sup>. Les lysosomes périphériques sont plus alcalins que les lysosomes localisés au centre. Les lysosomes périphériques présentent une fuite de protons plus élevée et une activité V-ATPase réduite par rapport aux lysosomes localisés au centre de la cellule<sup>109</sup>. En raison d'une activité V-ATPase plus élevée, les lysosomes périnucléaires sont préférentiellement utilisés pour la dégradation protéolytique<sup>109</sup>. Ainsi, la localisation des lysosomes influencerait l'activité de la V-ATPase, qui est cruciale pour le maintien du pH intraluminal et l'activité des hydrolases acides.

Le statut nutritionnel cellulaire influence également la localisation et la motilité des lysosomes pour réguler l'activité de mTORC1. Dans des conditions riches en nutriments, mTORC1 est activé sur les lysosomes périphériques pour assurer une proximité étroite avec les récepteurs de signalisation à la surface cellulaire<sup>106</sup>. A l'inverse, le manque de nutriments réprime l'activité de mTORC1 et induit un regroupement périnucléaire des lysosomes en raison de changements dans le pH luminal du lysosome, qui à son tour est critique pour la formation d'autophagosome et la fusion autophagosome-lysosome<sup>106</sup> (**Figure 15**).

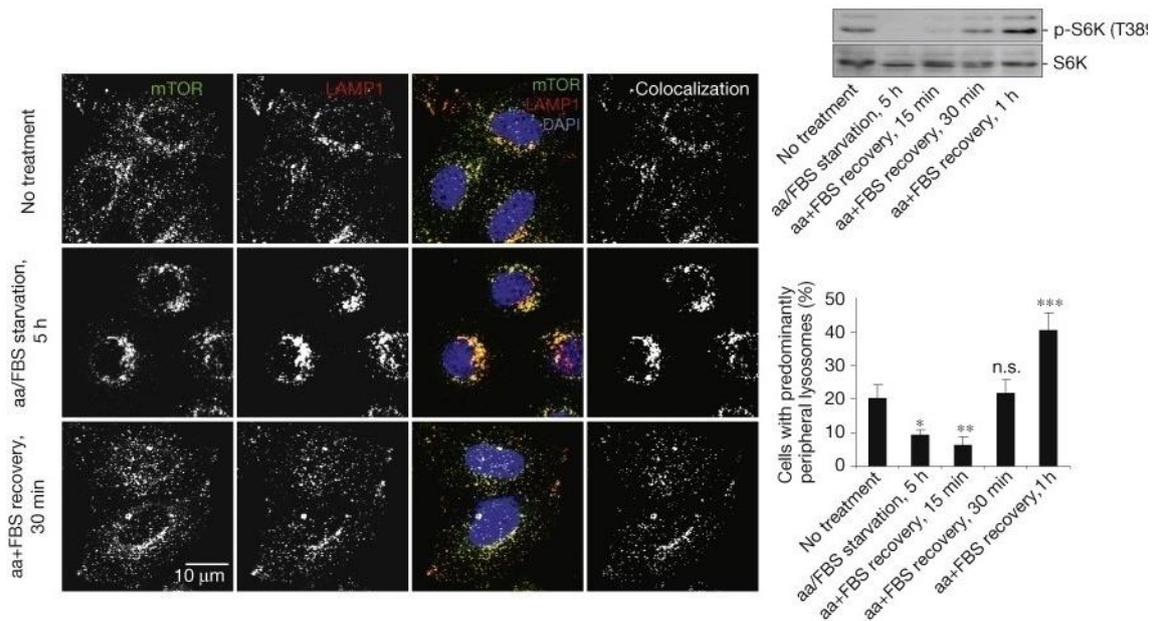


Figure 15. Modulation de la position des lysosomes et de l'activité de mTORC1 en fonction de l'état nutritionnel de la cellule. A droite en haut : activité mTOR représentée par l'état de phosphorylation de S6K, un site de phosphorylation spécifique ; A droite en bas : moyenne +/- SEM, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.005 test de Student ; n.s. : not significant ; FBS : fetal bovine serum. D'après <sup>106</sup>

### b) Équilibre ionique dans la fonction du lysosome

Le gradient ionique lysosomal est indispensable à l'acidification intraluminaire, à la stabilité des hydrolases acides et à la dégradation des macromolécules. Les ions lysosomaux sont impliqués dans la biogénèse du lysosome, sa motilité, la formation des sites de contact membranaire et l'homéostasie du lysosome.

La concentration lysosomale en  $\text{Ca}^{2+}$  est nécessaire pour la fusion endosome-lysosome et régule la mobilisation du lysosome, l'exocytose, le trafic membranaire et vésiculaire et la formation des sites de contact membranaire<sup>100,110</sup>.

La fonction lysosomale dépend de l'acidification de sa lumière : un pH acide permet de stabiliser et d'activer les hydrolases lysosomales. Un pH d'environ 4,6 est maintenu grâce à l' $\text{H}^+$ -ATPase vacuolaire (V-ATPase), la pompe à protons située dans la membrane lysosomale, avec une concentration en  $\text{H}^+$  de 25  $\mu\text{M}$  en moyenne soit environ 500 fois la concentration cytosolique en  $\text{H}^{+111}$ . L'activité de la pompe à proton, la concentration en  $\text{H}^+$  et donc le pH intra-lysosomal dépendent de la localisation du lysosome et du statut nutritionnel de la cellule<sup>109</sup> (Figure 16).

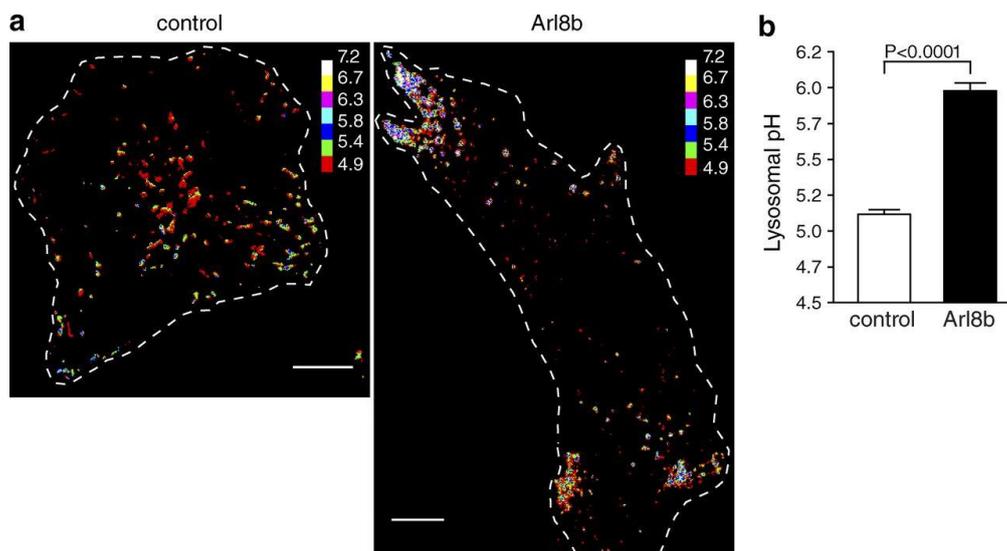


Figure 16. Les lysosomes déplacés à la périphérie de la cellule par l'expression d'Arl8b sont plus alcalins. Arl8b, une petite GTPase présente à la surface des lysosomes, se lie au moteur centrifuge kinésine-1 par l'intermédiaire de son effecteur SKIP. L'expression d'Arl8b entraîne une accumulation de lysosomes à la périphérie de la cellule. Le pH lysosomal est mesuré par microscopie à fluorescence ratiométrique. Le pH lysosomal a été déterminé dans des cellules témoins et des cellules exprimant Arl8b. (a) Barres d'échelle : 10  $\mu$ m. (b) Les barres d'erreur représentent le SEM (standard errors of the mean, n = 30 et 39 cellules).<sup>109</sup>

Le Na<sup>+</sup> est le cation le plus abondant dans le lysosome<sup>112</sup>. Son rôle principal est le maintien du potentiel de membrane de la membrane lysosomale<sup>113</sup>.

Les ions métalliques tels que Fe<sup>3+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> et Cu<sup>2+</sup> peuvent être relargués par le lysosome par protéolyse, endocytose ou phagocytose de metalloprotéines<sup>114</sup>. La régulation de la prolifération cellulaire par l'activité lysosomale nécessite l'homéostasie du fer intra-lysosomal<sup>115</sup>.

### c) Sites de contact entre lysosomes et autres organelles

Les lysosomes forment des points de contact membranaire (*membrane contact sites*, MCS) avec d'autres organelles (réticulum endoplasmique, mitochondrie, peroxysome...) permettant le transfert d'information, le partage de métabolites et de faciliter l'homéostasie ionique<sup>116</sup>. Cette communication inter-organelle impacte de manière fondamentale la fonction lysosomale et l'homéostasie cellulaire. En voici quelques exemples.

#### - Lysosome-RE

Les MCS entre les lysosomes et le réticulum endoplasmique sont impliqués dans la signalisation calcique, le trafic endosomal, la maturation des EE en endo-lysosome et la biogenèse du lysosome et la position des lysosomes<sup>116,117</sup> (**Figure 17**).

Les MCS entre les lysosomes et le RE permet le transfert du cholestérol libéré au sein du lysosome par l'hydrolyse des esters de cholestérols-LDL vers le RE<sup>118</sup>. Un cholestérol cellulaire bas favorise la formation de MCS lysosome-RE. Ceci entraîne la perturbation de l'interaction dynéine-dynactine lysosomale et l'accumulation des LE à la périphérie de la cellule<sup>117</sup>. A l'inverse, une augmentation du cholestérol intracellulaire inhibe la formation de MCS lysosome-RE et permet la mobilisation des lysosomes vers le centre de la cellule.

La libération de  $\text{Ca}^{2+}$  lysosomal entraîne la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  par le RE. Il existe une régulation bidirectionnelle de la signalisation calcique entre le lysosome et le RE<sup>119,120</sup>.

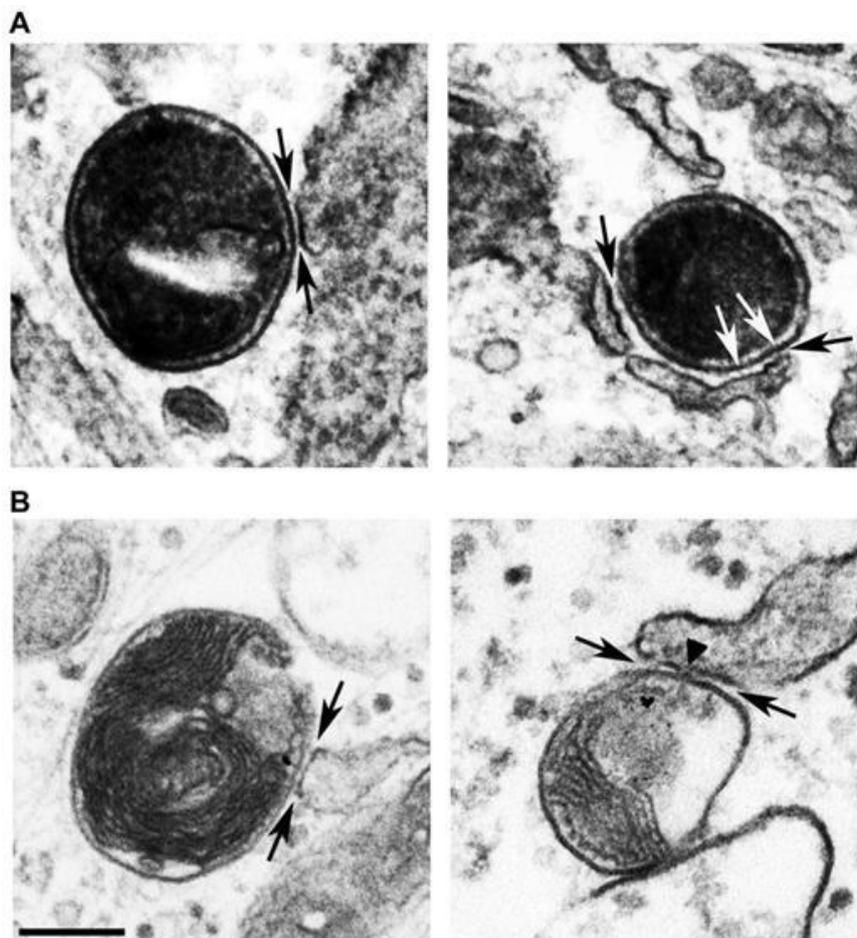


Figure 17. Sites de contact entre lysosome et réticulum endoplasmique. Microscopie électronique. Les sites de contact membranaires indiqués par des flèches noires. Les flèches blanches indiquent les fibres reliant les membranes opposées et les pointes de flèche les régions d'apposition de membranes. Barre d'échelle : 200 nm.<sup>116</sup>

#### - Lysosome-mitochondrie

Environ 15% des lysosomes forment un MCS avec des mitochondries<sup>121</sup>. La formation de MCS stables est induite par la protéine Rab7 liée au GTP. De la même manière, l'hydrolyse de Rab-GTP entraîne le

découplage de la mitochondrie et du lysosome<sup>122</sup>. La formation de MCS est indépendante du processus de mitophagie<sup>121</sup> (**Figure 18**).

La fonction lysosomale ainsi que le calcium lysosomal sont des éléments essentiels de la régulation et de l'homéostasie de la mitochondrie<sup>122-124</sup>. Le canal TRPML1 situé sur la membrane du lysosome, libère du calcium en réponse à l'augmentation des ROS mitochondriales. Afin d'éliminer les ROS et les mitochondries endommagées, la biogenèse des lysosomes ainsi que l'autophagie sont accrues par l'activation de la calcineurine dépendante des ROS et par la translocation nucléaire de TFEB (*Transcription Factor EB*) qui s'ensuit<sup>124</sup> (voir IV.3).

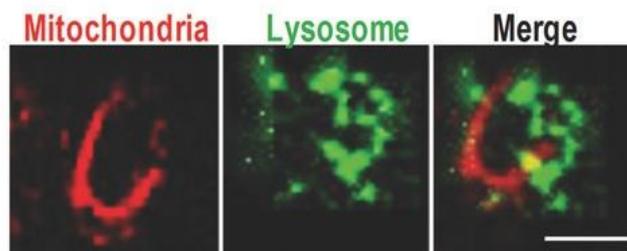


Figure 18. Colorant complexe d'iridium(III) pour le suivi des contacts mitochondrie-lysosome. Barre d'échelle : 1  $\mu\text{m}$ .<sup>121</sup>

#### d) La fission lysosomale

La fission des lysosomes est cruciale pour maintenir des niveaux stables de nombre et de taille de lysosomes<sup>125</sup>. La fission du lysosome implique des événements de vésiculation, de tubulation et de « kiss-and-run »<sup>126</sup> (voir III.1. Biogenèse du lysosome).

Pendant les périodes prolongées de déficit en nutriments, le déclin initial de la teneur en lysosomes cellulaires se produit en même temps que la formation d'autolysosomes (AL), suivi d'une reconstitution *de novo* du pool lysosomal. Ce processus de formation *de novo* de lysosomes est appelé reformation lysosomale autophagique (*autophagic lysosomal reformation*, ALR)<sup>127</sup>. Ainsi, un déficit aigu en nutriments augmente la teneur en AL, tandis qu'un déficit chronique restaure le contingent de lysosomes aux niveaux observés à l'état nourri<sup>128</sup>.

## IV. Les rôles du lysosome : un régulateur de l'homéostasie cellulaire

### 1. Dégradation

Les lysosomes reçoivent et digèrent le matériel généré par l'endocytose de petites molécules et des protéines de surface, par la phagocytose de grands éléments tels que les corps apoptotiques et les bactéries phagocytées, ou encore par l'autophagie du contenu cytoplasmique, y compris les mitochondries, réticulum endoplasmique et lysosomes endommagés<sup>129-133</sup>. Les organites endommagés sont inclus dans l'autophagosome qui fusionne avec un lysosome, entraînant sa dégradation et le recyclage de ses composés. Les produits de digestion sont exportés et réutilisés afin de maintenir l'homéostasie de la cellule.

En conséquence, les lysosomes ont longtemps été considérés comme l'usine de recyclage de la cellule.

Les lysosomes contiennent des enzymes luminales qui dégradent les macromolécules intracellulaires et extracellulaires via l'autophagie<sup>134</sup>. Pour maintenir l'équilibre énergétique cellulaire et l'homéostasie des organelles, l'autophagie (auto-digestion) dégrade une partie du cytoplasme et recycle les protéines à demi-vie courte et longue, les agrégats de protéines, les mitochondries (mitophagie), les noyaux (nucléophagie), le réticulum endoplasmique (réticulophagie), les gouttelettes lipidiques (lipophagie) et les peroxysomes (pexophagie)<sup>73,135-137</sup>. Il est à noter que l'autophagie est la seule voie de dégradation des protéines à demi-vie longue, non dégradées par le protéasome. Plusieurs types d'autophagie sont décrits dans les cellules de mammifères : (1) la macroautophagie, (2) la microautophagie impliquant la pinocytose des régions cytosoliques aux abords des lysosomes, dégradant ainsi la cargaison cytosolique et (3) l'autophagie médiée par les chaperonnes (*chaperone-mediated autophagy*, CMA) (**Figure 19**).

#### - Macroautophagie

La macroautophagie se produit dans un organite à double membrane dérivé du réticulum endoplasmique, connu sous le nom d'autophagosome, qui permet la livraison en vrac de protéines et de cargaison d'organites aux lysosomes pour la protéolyse. L'autophagie lysosomale joue également un rôle important dans la dégradation des gouttelettes lipidiques via un processus appelé « lipophagie »<sup>134</sup>. En plus de la lipophagie, la mitophagie assure le contrôle de la qualité des mitochondries en dégradant les mitochondries dysfonctionnelles et en maintenant des mitochondries fonctionnellement actives<sup>136</sup>. Les mitochondries dysfonctionnelles qui sont incapables de gérer la surcharge en ROS sont ciblées pour la mitophagie. Les lysosomes endommagés sont également soumis à une réparation ou à une élimination, mais avec l'aide du complexe de tri dépendant de la machinerie

ESCRT (*ESCRT machinery-dependent sorting complex*). Le processus de dégradation des lysosomes endommagés via la macroautophagie sélective est appelé « lysophagie »<sup>138,139</sup>.

- Microautophagie

La microautophagie est un processus dans lequel l'invagination directe des lysosomes facilite la dégradation intracellulaire de protéines et d'organelles.

- Autophagie médiée par les chaperonnes (CMA)

La CMA est initiée environ 10 heures après le jeûne et, contrairement à la macroautophagie, favorise la dégradation sélective des protéines<sup>140</sup>. CMA cible environ 35 % des protéines cytosoliques solubles qui abritent un motif consensus KFERQ (séquence d'acides aminés : lysine (K), phénylalanine (F), acide glutamique (E), arginine (R) et glutamine (Q)), pour la dégradation lysosomale<sup>140</sup>. Les chaperonnes cytosoliques, la protéine HSC70 (*heat-shock cognate protein of 70kDa*) et la protéine HSP90 (*heat-shock protein 90*) reconnaissent le motif KFERQ et délivrent des protéines ciblées à la surface lysosomale pour se lier à LAMP-2<sup>141</sup>. Lors de la liaison à LAMP-2, la protéine substrat est dépliée, transloquée et rapidement dégradée dans la lumière lysosomale. Les protéines subissant une dégradation par le CMA présentent divers rôles dans une myriade de processus intracellulaires, soulignant l'importance de la biogenèse du lysosome dans le fonctionnement et le métabolisme cellulaires.

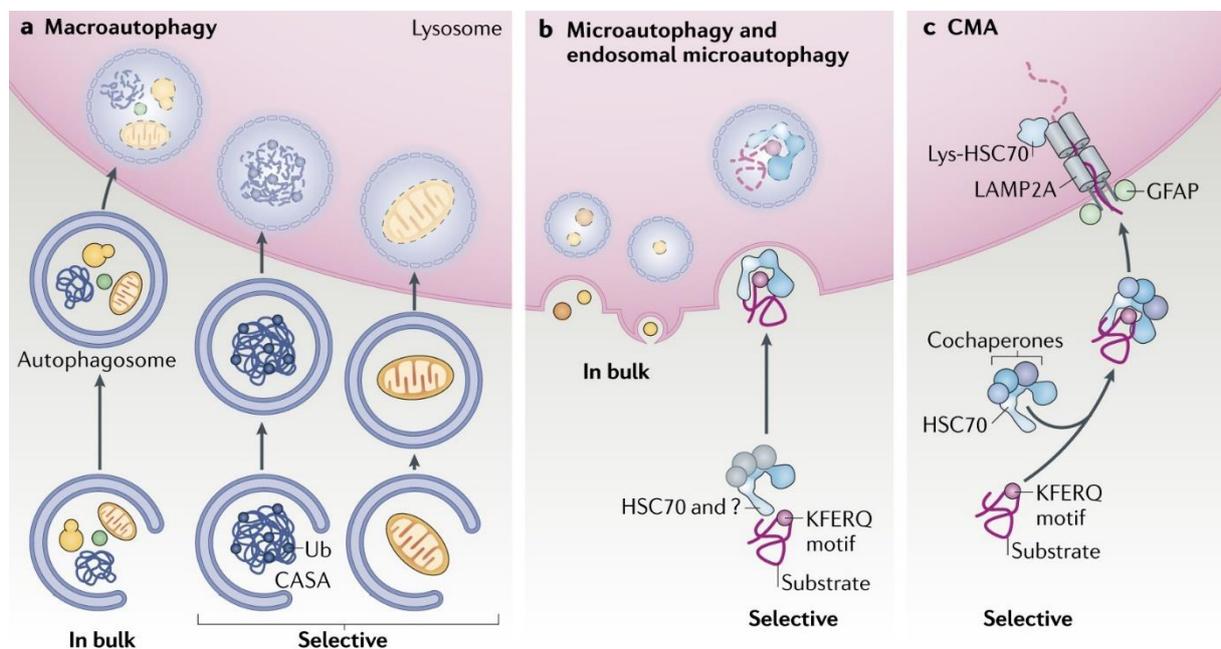


Figure 19. Voies de l'autophagie chez les mammifères. CASA : chaperone-assisted selective autophagy ; GFAP : glial fibrillary acidic protein ; lys-HSC70: lysosomal HSC70 ; Ub : ubiquitine. D'après <sup>142</sup>

Les macromolécules à dégrader sont transportées via des vésicules sécrétrices via la voie de l'endocytose, de l'autophagie ou de la phagocytose. La fusion entre LE et lysosomes a lieu majoritairement dans la région du noyau. La fusion a lieu lorsque deux organelles forment un MCS sur une distance d'environ 25 nm par le biais d'un processus d'attachement<sup>143</sup>.

Les lysosomes fusionnent également avec les autophagosomes, une étape critique dans la dégradation des macromolécules via la formation d'autolysosomes<sup>144</sup>. Cette fusion nécessite un transport coordonné des lysosomes et des autophagosomes vers la région péri-nucléaire, qui a lieu en l'absence de nutriments disponibles par exemple, avec l'augmentation du pH intracellulaire<sup>103,145</sup>.

Initialement, la fusion des autophagosomes et de l'endosome/lysosome tardif se produit pour générer un organite hybride entièrement mature. Cependant, plusieurs organites fusionnent fréquemment pour échanger leur contenu au cours d'événements « *kiss and run* », bien qu'il s'agisse de vésicules séparées<sup>146</sup>.

## 2. Le lysosome, une plaque tournante métabolique

Plus récemment, les nombreuses fonctions du lysosome, au-delà de sa fonction de dégradation, ont été reconnues<sup>147</sup>. C'est une structure dynamique qui joue un rôle important dans l'homéostasie cellulaire et l'adaptation, le développement et le vieillissement<sup>29,107</sup>. Il constitue un hub de signalisation et est essentiel pour la détection et l'homéostasie de l'énergie et des acides aminés ainsi que pour la régulation de l'autophagie<sup>40,148-150</sup>. Les lysosomes interagissent avec d'autres organites tel que le réticulum endoplasmique et les mitochondries, interactions nécessaires pour un maintien mutuel de l'homéostasie et sont impliqués dans la sécrétion et la réparation de la membrane plasmique<sup>108,123,151</sup>.

Ainsi, le lysosome est maintenant reconnu comme un véritable hub métabolique, avec de fonctions multiples et un rôle dans de nombreux processus cellulaires (**Figure 20**) :

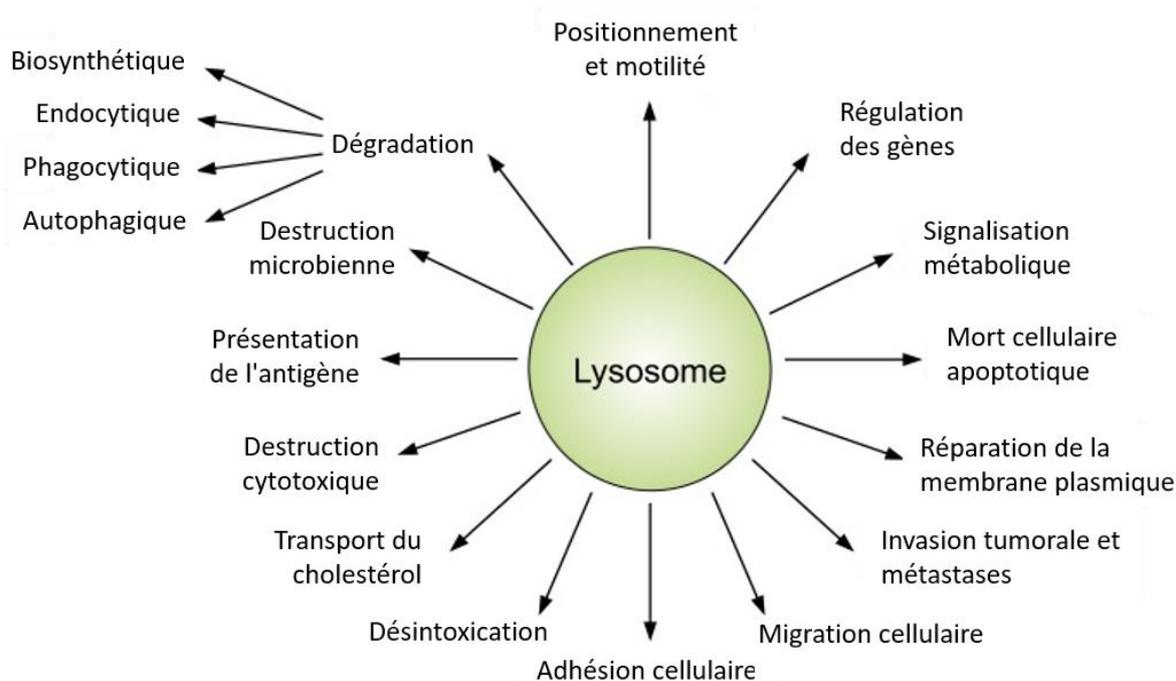


Figure 20. Les fonctions multiples du lysosome. D'après <sup>107</sup>

### La détection lysosomale des nutriments

Le lysosome est le principal médiateur du catabolisme cellulaire et joue donc un rôle central dans l'adaptation métabolique de la cellule. Comme vu précédemment, la détection lysosomale des nutriments est médiée par mTORC1, un régulateur clé des voies de biosynthèse cellulaire, qui s'associe dynamiquement aux lysosomes<sup>152,153</sup>.

### La signalisation calcique lysosomale

Le  $\text{Ca}^{2+}$  lysosomal régule le trafic des membranes endocytaires, l'autophagie et la réparation des membranes endommagées (voir ci-dessus) en déclenchant la fusion lysosomale avec d'autres structures cellulaires telles que les endosomes, les autophagosomes et la membrane plasmique<sup>154,155</sup>. L'homéostasie du  $\text{Ca}^{2+}$  est importante pour l'acidification lysosomale requise pour l'activité d'hydrolyse<sup>111</sup>.

Les canaux  $\text{Ca}^{2+}$  lysosomaux répondent à de multiples stimuli tels que l'ATP, le NADP, les phospholipides et la sphingosine : leur activité et les réponses de signalisation calciques sont modulées en fonction des conditions cellulaires. Par exemple, TRPML1 (ou mucopolipine 1) peut être activé par un manque de nutriments, par les ROS et par le phosphatidylinositol 3,5-biphosphate, reliant la signalisation calcique lysosomale aux processus de signalisation intracellulaire<sup>124,156-158</sup>.

### La mort cellulaire dépendante des lysosomes

Les dommages infligés au lysosome, comme en cas d'infection, induisent une perméabilisation ou une rupture de la membrane lysosomale, entraînant la fuite de cathepsines et conduisant à un type de mort cellulaire appelée mort cellulaire dépendante du lysosome (*lysosome-dependent cell death*)<sup>159</sup>. Elle peut prendre la forme d'apoptose, de nécroptose ou d'autres formes de morts cellulaires. Pour empêcher l'activation des voies de la mort cellulaire, les lysosomes endommagés peuvent être éliminés ou réparés par un processus appelé réponse aux dommages endolysosomaux (*endolysosomal damage response*)<sup>160,161</sup>. L'élimination et le recyclage des lysosomes endommagés se font par la voie d'autophagie sélective appelée « lysophagie »<sup>132</sup>.

### La détection de cargaison autophagique et réponse pro-inflammatoire

Les lysosomes détectent non seulement les nutriments et les métabolites, mais reconnaissent également les acides nucléiques. Les récepteurs de type Toll (TLR), un groupe de protéines que l'on trouve principalement dans les macrophages et les cellules dendritiques, jouent un rôle crucial dans ce processus<sup>56,162</sup>. Les TLR peuvent identifier des patterns spécifiques associés à des agents pathogènes, initiant la réponse immunitaire innée. Parmi les 13 membres de la famille TLR, TLR3, TLR7/8 et TLR9 proviennent des endolysosomes. L'activation de ces récepteurs par les acides nucléiques microbiens déclenche des voies de signalisation qui impliquent divers adaptateurs, conduisant au déplacement de certains facteurs de transcription (facteur nucléaire- $\kappa$ B, ou NF- $\kappa$ B, ou facteurs régulateurs de l'interféron) vers le noyau. Ceux-ci, à leur tour, stimulent la production de cytokines inflammatoires et d'interférons<sup>163</sup>.

### L'exocytose lysosomale (fusion des lysosomes avec la membrane plasmique)

Les lysosomes régulent également les vésicules sécrétoires par l'exocytose des lysosomes. L'exocytose du lysosome implique deux étapes principales : (1) le déplacement du lysosome vers la périphérie cellulaire pour la fusion avec la membrane plasmique et (2) l'exocytose du contenu luminal du lysosome dans le milieu extracellulaire. L'exocytose lysosomale est primordiale pour divers processus physiologiques cellulaires tels que la réparation des membranes plasmiques (PMR), la réponse immunitaire, la résorption osseuse et la signalisation cellulaire<sup>164</sup>. L'intégrité des membranes plasmiques est perdue lors d'une lésion, ce qui entraîne un échange illimité de composants intra- et extra-cellulaires déclenchant la mort cellulaire ; ainsi, la réparation des membranes plasmiques est cruciale pour le maintien de l'homéostasie cellulaire.

Lors d'une lésion de la membrane plasmique la cellule est capable de détecter les augmentations de concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire qui peuvent être liées à un efflux de calcium extracellulaire suite à une lésion de la membrane plasmique. La cellule réagit alors en déclenchant une exocytose lysosomale<sup>165</sup>. En effet, le calcium cytosolique favorise la fusion du lysosome avec la membrane plasmique. Les protéines du cytosquelette et les protéines motrices induisent un trafic de lysosomes à la périphérie cellulaire vers les membranes endommagées où les lysosomes fusionnent avec la membrane plasmique et vident leur contenu dans l'espace extracellulaire. Suite à la fusion membranaire, l'exocytose provoque l'efflux de la sphingomyélinase acide qui convertit la sphingomyéline de la membrane plasmique en céramide<sup>166</sup>. Cela se traduit par une courbure de la membrane plasmique vers l'intérieur de la cellule, facilitant l'endocytose. L'endocytose permet alors d'éliminer la zone endommagée et la « cicatrisation » de la membrane cellulaire<sup>166,167</sup> (**Figure 21**).

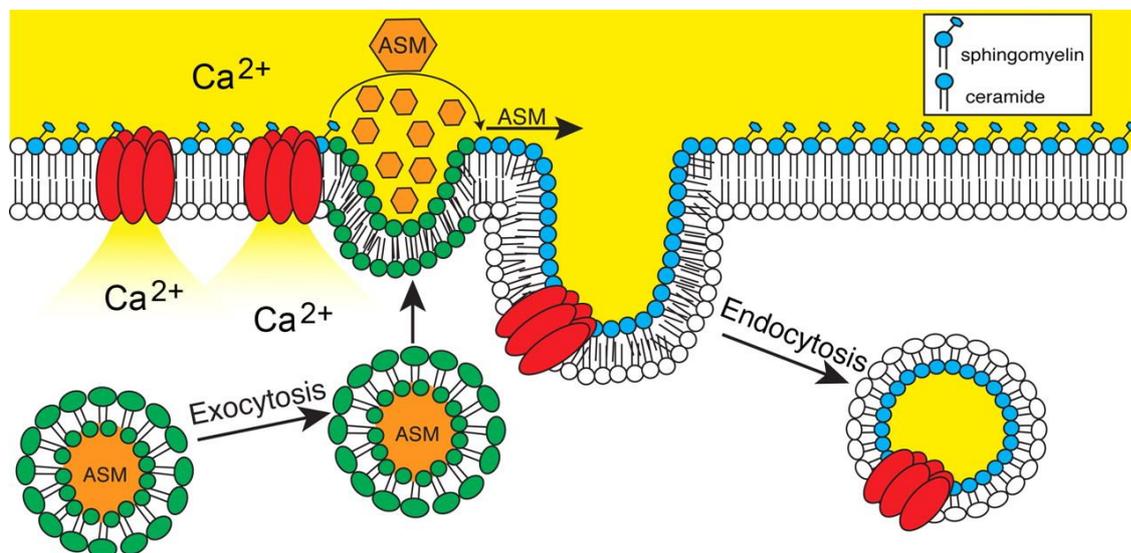


Figure 21. Modèle de réparation de la membrane plasmique par la sphingomyélinase acide sécrétée.

Le  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire pénètre dans les cellules en cas de lésion de la membrane plasmique (en rouge des pores formés par l'insertion d'une toxine bactérienne). L'élévation de la concentration intracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$  déclenche l'exocytose des lysosomes. La sphingomyélinase acide est acheminée vers le feuillet externe de la membrane plasmique, où elle convertit la sphingomyéline en céramide. Le céramide s'auto-associe en microdomaines qui bourgeonnent dans les cellules, générant des endosomes qui internalisent les lésions et referment la membrane plasmique.<sup>166</sup>

### 3. L'adaptation lysosomale

Le métabolisme énergétique cellulaire est influencé par des signaux environnementaux. Le lysosome doit adapter sa fonction pour maintenir l'homéostasie dans différentes conditions environnementales. Pour comprendre comment la cellule régule l'ensemble du lysosome, les chercheurs ont identifié un réseau de gènes transcriptionnels appelé « CLEAR » (*coordinated lysosomal expression and regulation*,

expression et régulation lysosomales coordonnées) à l'aide d'approches *in silico*. Ce réseau comprend des gènes impliqués dans la fonction lysosomale et l'autophagie. Le facteur nucléaire TFEB est le maître régulateur de ce réseau. TFEB et le réseau CLEAR permettent de contrôler globalement la fonction lysosomale et l'autophagie<sup>168,169</sup>.

Le TFEB contrôle l'autophagie et la fonction lysosomale en régulant les gènes impliqués dans différentes étapes de la formation de l'autophagosome, de la fusion autophagosome-lysosome et des voies de dégradation lysosomale<sup>168-170</sup>. Il supervise des processus tels que l'acidification lysosomale, l'homéostasie du calcium<sup>170,171</sup>, l'exocytose et le positionnement des lysosomes<sup>168,170-172</sup>. TFEB agit comme un régulateur central du flux autophagique en gérant la livraison de la cargaison et la dégradation du substrat.

TFEB et d'autres membres de la même famille de protéines tels que TFE3 régulent également d'autres processus cellulaires, notamment l'UPR (*unfolded protein response*), l'endocytose et la différenciation des cellules souches<sup>173</sup>.

Dans des conditions normales, TFEB est principalement situé dans le cytoplasme et est transloqué vers le noyau en cas de manque de nutriments<sup>168,169</sup>. Sa localisation subcellulaire est influencée par diverses conditions telles que les infections, l'inflammation, le stress oxydatif, le stress du RE et les lésions mitochondriales<sup>56,174-177</sup>. mTORC1 qui est une kinase est le régisseur principal de l'état de phosphorylation de TFEB (phosphorylation de résidus spécifiques de sérine). Cette phosphorylation joue un rôle clé dans la régulation de la localisation subcellulaire du facteur de transcription<sup>178</sup> (**Figure 22**).

La stabilité de TFEB est régulée par l'ubiquitine ligase E3 dépendante du chaperon STUB1, qui cible TFEB phosphorylé pour sa dégradation par la voie ubiquitine-protéasome<sup>179</sup>.

D'autres régulateurs transcriptionnels de la biogenèse des lysosomes ont été décrits, tels que BRD4, STAT3 et une arginine méthyltransférase associée à un coactivateur de protéine régulé par l'AMPK (CARM1)<sup>180-182</sup>.

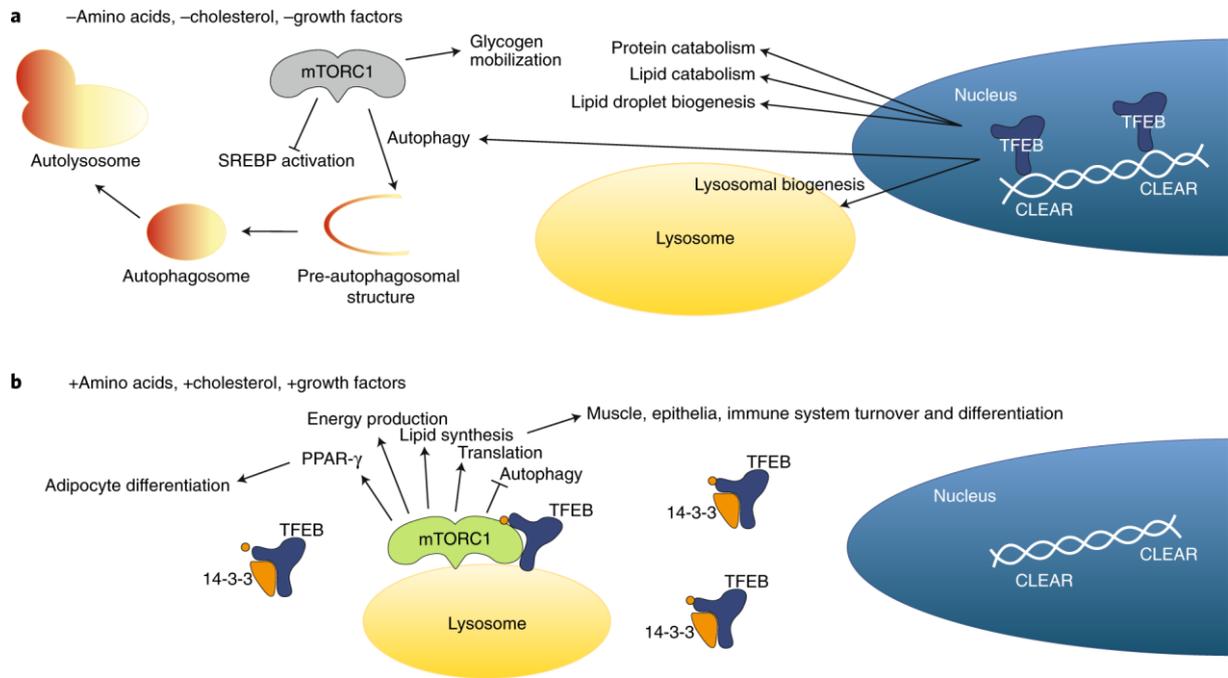


Figure 22. Régulation dépendante du lysosome de la physiologie cellulaire en réponse aux nutriments. a) Lorsque les niveaux de nutriments et les signaux des facteurs de croissance sont faibles, mTORC1 est inhibé. En conséquence, l'autophagie cellulaire augmente et les voies anaboliques (tel que la lipogenèse dépendante de la protéine de liaison des éléments régulateurs des stéroïdes (SREBP)) sont inhibées. TFEB se déplace vers le noyau, se lie aux régions promotrices du réseau CLEAR et active les gènes contrôlant l'autophagie, la biogenèse des lysosomes et le catabolisme des lipides, permettant l'adaptation aux conditions pauvres en nutriments et le maintien des cellules souches. b) En présence de hauts niveaux de nutriments et de signaux de facteurs de croissance, mTORC1 phosphoryle la famille de facteurs de transcription MiT/TFE (dont TFEB fait partie), favorisant leur exclusion du noyau (par l'association aux protéines 14-3-3). L'activité de mTORC1 favorise également la traduction, la synthèse des lipides et la production d'énergie afin d'augmenter le renouvellement et la différenciation des muscles, de l'épithélium et du système immunitaire. En outre, la phosphorylation du récepteur activé par les proliférateurs de peroxydases-γ (PPAR-γ) dépendante de mTORC1 favorise la différenciation des adipocytes.<sup>183</sup>

## V. Techniques d'études du lysosome

De nombreuses méthodes d'analyse du lysosome – de sa morphologie, son positionnement, sa motilité et sa fonction – ont été développées. Celle-ci sont principalement utilisées dans le cadre de la recherche. Dans le cadre du diagnostic des maladies lysosomales, les techniques d'analyse du fonctionnement du lysosome, avec principalement les dosages d'activité enzymatique, sont mises à contribution. De récentes techniques d'isolation des lysosomes ont permis de caractériser l'ensemble du lysosome grâce aux techniques omiques (protéomique, lipidomique, etc.). Il ne s'agit alors plus d'étudier une cellule, un tissu ou un milieu, mais de descendre à l'échelle de l'organite.

Voici quelques exemples des méthodes utilisées<sup>184</sup> :

### 1. Visualisation des lysosomes

- Par microscopie optique : par immunomarquage des protéines lysosomales ou utilisation de cargaisons internalisées par endocytose
- Par microscopie électronique

### 2. Méthodes d'étude du fonctionnement du lysosome

- Sites de contact lysosomal : par détection in situ des interactions protéiques par l'utilisation d'anticorps primaires et secondaires ou approches biochimiques couplées à la microscopie confocale
- pH des lysosomes : par l'utilisation de sondes acidotropes fluorescentes telles que le LysoTracker
- Biogenèse des lysosomes : augmentation du nombre de lysosomes évalué par Western blot ou immunofluorescence, ou analyse de l'activité du TFEB par mesure de l'expression des gènes hébergeant des sites CLEAR dans leur promoteur par PCR quantitative
- Activité TFEB et mTORC1 : par immunofluorescence, Western blot, PCR quantitative ou mesure de la phosphorylation des cibles de mTORC1
- Positionnement des lysosomes : par mesure de la distance de chaque lysosome par rapport au noyau ou calcul de la fraction de lysosomes totaux par région subcellulaire d'intérêt
- Motilité des lysosomes : par marquage lysosomal combiné à l'expression d'un marqueur fluorescent tel que le GFP, sous microscope à fluorescence
- Perméabilisation de la membrane lysosomale : en évaluant l'acidification des différents compartiments ou par l'utilisation de marqueurs tels que la galectine 3 (GAL3)
- Analyse biochimique de l'activité des hydrolases acides lysosomales : par l'utilisation de substrats naturels radiomarqués ou de substrats 4-méthylumbelliférone (4-MU) synthétiques
- Exocytose des lysosomes : par détection des protéines membranaires lysosomales au niveau de la membrane plasmique par cytométrie en flux ou microscopie à fluorescence, des enzymes lysosomales libérées dans le milieu extracellulaire par Western blot ou par microscopie électronique

### 3. Méthodes d'isolement des lysosomes

Les fractions enrichies en lysosomes peuvent être obtenues par des méthodes basées sur des milieux à gradient de densité ou par décalage de densité, ou encore par immunopurification des lysosomes (protocole LysolP).

## Conclusion

Le lysosome est encore souvent considéré comme un organite avec une fonction distincte de tri, de sécrétion et de protéolyse ; c'est l'usine de recyclage de la cellule.

Mais de récentes découvertes ont révolutionné la vision du lysosome : d'un organite assurant l'élimination et le recyclage des déchets cellulaires, il est devenu une structure dynamique ayant un rôle de médiateur dans l'adaptation du métabolisme cellulaire aux signaux environnementaux grâce aux processus de biogenèse et d'autophagie, ainsi qu'à leur capacité de détection des nutriments mTOR1-médiée et la régulation transcriptionnelle des fonctions lysosomales. Les courants ioniques lysosomaux participent à la signalisation cellulaire, l'exocytose et la réparation des membranes (**Figure 23**).

Les dysfonctionnements lysosomaux (déficits enzymatiques, déficits de transporteurs, déficits de protéines impliquées dans la biogénèse du lysosome) entraînent un large éventail de dysfonctionnements cellulaires. La caractéristique cellulaire la plus marquante de l'atteinte du lysosome est l'accumulation de substrat que les lysosomes ne sont pas en mesure de décomposer. Les conséquences sont connues sous le nom de maladies de surcharge lysosomale. Au fur et à mesure que les fonctions du lysosome ont été déterminées et que les maladies lysosomales ont été considérées comme des pathologies plus complexes, le terme de « surcharge » est devenu obsolète et la dénomination préférée est désormais simplement « maladies lysosomales ».

L'altération de la fonction lysosomale est également à l'origine de maladies neurodégénératives, de cancers, de maladies cardiovasculaires et de troubles métaboliques<sup>185-189</sup>.

Des approches systémiques telles que la transcriptomique, la métabolomique et la protéomique, ainsi que l'imagerie dans diverses cellules et organismes, ont permis et permettront de mieux comprendre les processus impliqués dans le maintien de la fonction des lysosomes et les conséquences d'un éventuel dysfonctionnement.

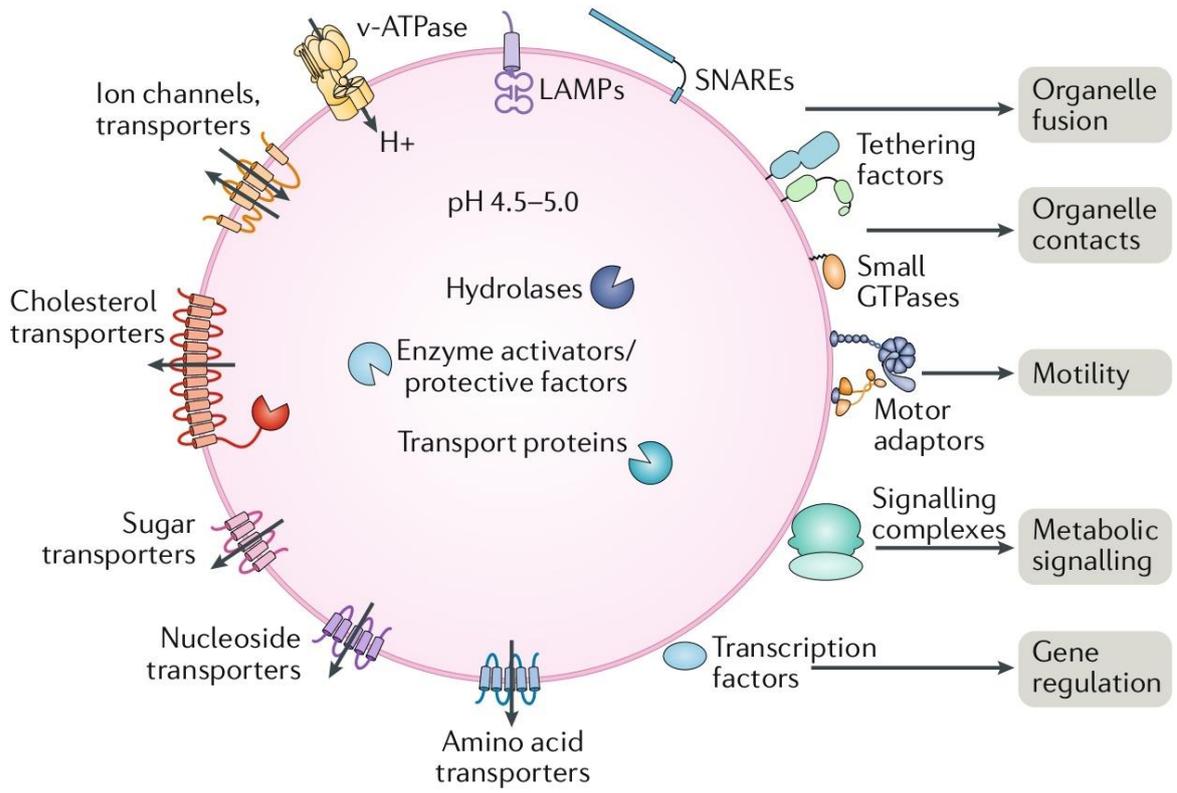


Figure 23. Propriétés des lysosomes.<sup>29</sup>

## CHAPITRE III : Les maladies lysosomales

### I. Histoire des maladies lysosomales

La première description d'une maladie lysosomale a été celle de la maladie de Tay-Sachs en 1881. Près d'un siècle plus tard, en 1963, Henri G. Hers mit en évidence une  $\alpha$ -glucosidase acide capable d'hydrolyser le glycogène, enzyme déficiente dans la glycogénose de type II (maladie de Pompe), une maladie héréditaire sévère caractérisée par des dépôts de glycogène anormal dans un certain nombre de tissus<sup>190</sup>. Cette enzyme a rapidement été identifiée comme une enzyme lysosomale<sup>191</sup>. Hers proposa que les molécules de glycogène sont internalisées par autophagie et sont dégradées dans le lysosome par la glucosidase, et que lors d'un déficit de l'enzyme, les dépôts de glycogène sont localisés dans les lysosomes. Ceci sera confirmé plus tard morphologiquement<sup>192</sup>. Hers généralisa cette interprétation au concept de « maladie innée du lysosome » (*inborn lysosomal disease*) qu'il a défini comme le déficit génétique d'une enzyme lysosomale entraînant l'accumulation intralysosomale des composants normalement dégradés par cette enzyme<sup>193</sup>. Ce concept jeta une lumière unificatrice sur une variété de mucopolysaccharidoses et de lipidoses dont les mécanismes sous-jacents étaient encore inconnus. Huit ans plus tard sera publié *Lysosomes and Storage Diseases*<sup>194</sup>.

Entre les années 1970 et 1990, la recherche dans ce domaine s'est concentrée sur la voie du récepteur du mannose-6-phosphate et sur les mécanismes qui sous-tendent le tri des enzymes lysosomales, sur l'identification des bases moléculaires des maladies lysosomales et sur le développement d'outils et de stratégies pour étudier la biologie lysosomale<sup>195</sup>. Les premières tentatives de traitement de ces troubles par enzymothérapie substitutive ont débuté dans les années 1990. Les recherches actuelles se concentrent sur le rôle des lysosomes en tant que plateforme de signalisation contrôlant le métabolisme cellulaire et sur le développement de nouvelles approches thérapeutiques (**Figure 24**).

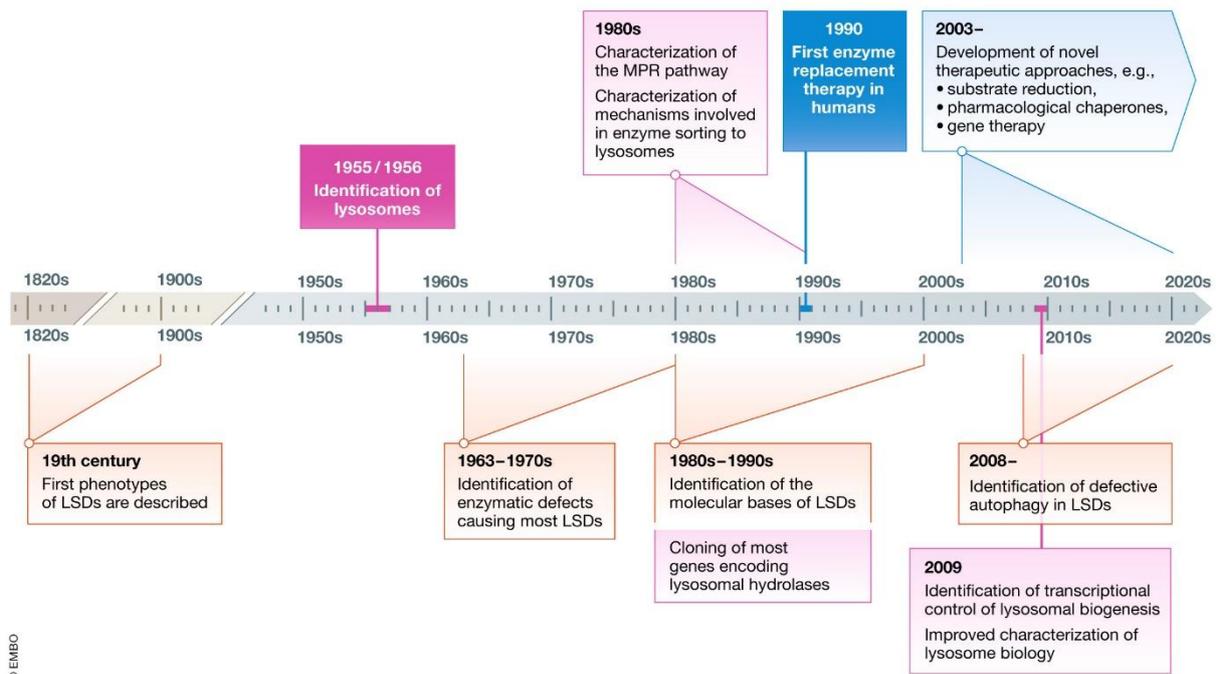


Figure 24. L'évolution des connaissances sur les ML.<sup>195</sup>

## II. Définition et classification

### 1. Définition

Les maladies lysosomales (ML) sont des maladies héréditaires du métabolisme affectant la fonction du lysosome. Les ML sont un groupe de 70 maladies génétiques du catabolisme lysosomal dont la plupart sont de transmission autosomique récessive. Les ML sont des maladies génétiquement et cliniquement hétérogènes avec un délai diagnostique souvent important. La compréhension de la physiopathologie des ML a connu des avancées majeures permettant d'identifier de nouveaux biomarqueurs et de nouvelles cibles thérapeutiques.

## 2. Épidémiologie

### a) Incidence et prévalence

En tant que groupe de pathologies, les ML ont une incidence estimée entre 1/5000 et 1/5500 ; mais prises individuellement, les ML sont rares avec des incidences estimées allant de 1 sur 50 000 à moins de 1 sur 1 000 000 naissances vivantes pour certaines<sup>196</sup>. Ces incidences peuvent augmenter de manière significative dans certaines populations à cause d'effets fondateurs<sup>197-199</sup> (**Tableau 3**).

Tableau 3. Augmentation de l'incidence des ML dans des populations spécifiques. D'après <sup>200</sup>

Disorder	Region or population	Incidence (per 100,000 individuals)
Gaucher disease type I	Ashkenazi Jews	100
Tay–Sachs disease (infantile)	Ashkenazi Jews	25
Niemann–Pick disease type A	Ashkenazi Jews	2.5
GM1 gangliosidosis	Rudari isolate	10
Metachromatic leukodystrophy	Western Navajo Nation	40
Pompe disease	The Netherlands	2.5
Cystinosis	Brittany	3.8
Salla disease	Finland or Sweden	2.5
Aspartylglucosaminuria	Finland	54
Niemann–Pick disease type C	Nova Scotia (French Acadian)	100
Fabry disease	Nova Scotia	9.3
Hermansky–Pudlak (types 1 and 3)	Puerto Rico	56

### b) Effet de la survie et du traitement

La prévalence est déterminée par l'incidence et la survie moyenne des patients. L'avènement de thérapies spécifiques et l'amélioration des soins de support ont augmenté la survie des patients – du moins dans les pays avec un système de santé couvrant ces pathologies – et pourraient augmenter la prévalence de ces maladies à l'avenir.

Cependant, à mesure que les traitements permettent d'allonger la durée de vie des patients, des « phénotypes secondaires » apparaissent, démasquant des atteintes liées à la pathologie qui n'avaient

pas le temps de se mettre en place du fait du décès précoce du patient. Ces complications supplémentaires pourraient nécessiter des interventions thérapeutiques supplémentaires<sup>200</sup>.

### III. Mécanismes, physiopathologie

Les variants pathogènes dans les gènes codant les protéines lysosomales, y compris les hydrolases acides lysosomales, les protéines de la membrane lysosomale, les transporteurs, les activateurs enzymatiques ou co-facteurs, sont responsables des maladies lysosomales. Ces variants entraînent un traitement et une dégradation aberrants des substrats, une altération du transport des lipides et des métabolites et une accumulation primaire progressive de macromolécules non dégradées ou partiellement dégradées à l'intérieur des lysosomes. Les tissus impliqués dans la pathologie vont dépendre, au moins en partie, de la répartition du substrat accumulé. Ainsi, dans les sphingolipidoses par exemple, certaines populations neuronales sont épargnées du fait de la répartition inégale des glycosphingolipides dans le système nerveux central.

En raison de leur rôle dans la clairance des débris cellulaires phagocytés, des cellules apoptotiques ou nécrotiques, des microorganismes et de leurs propres capacités de synthèse, les monocytes circulants et les macrophages tissulaires sont affectés au premier plan dans la plupart des maladies lysosomales. Ces cellules jouent un rôle central dans les réponses immunitaires et les processus inflammatoires. L'accumulation de macromolécules dans les macrophages déclenche une inflammation qui contribue activement à la progression de la maladie<sup>201,202</sup>.

La surcharge de substrats à l'intérieur des lysosomes peut initier une cascade d'effets secondaires, conduisant à terme à des dommages cellulaires irréversibles, puis à la mort cellulaire avec comme conséquence des atteintes d'organes.

S'il existe un large éventail de macromolécules accumulées dans les différentes ML, il est tout de même possible d'identifier plusieurs voies communes dérégulées : le transport et la dégradation cellulaires (autophagie, endocytose, phagocytose, exocytose lysosomale), l'homéostasie calcique, le stress oxydatif, les réponses immunitaires inflammatoires et innées et les voies de mort cellulaire (apoptose, nécroptose)<sup>203</sup>.

## IV. Diagnostic, dépistage et prévention

Comme mentionné précédemment, la grande majorité des ML est héritée de manière autosomique récessive. Les exceptions à ce schéma héréditaire comprennent la mucopolysaccharidose de type II (MPS II, récessive liée à l'X), la céréoïde lipofuscinose de type 4 (CLN4, formes dominantes et récessives), la maladie de Fabry et la maladie de Danon (liées à l'X).

### 1. Clinique

Les différentes maladies lysosomales, leur âge d'apparition, la protéine impliquée, les principaux symptômes et thérapies disponibles sont décrits dans le **Tableau 5** en fin de chapitre.

Les ML peuvent être classées en fonction du type de protéine impliquée et en fonction du substrat accumulé :

- Déficits enzymatiques
  - Sphingolipidoses
  - Mucopolysaccharidoses
  - Glycogénoses
  - Glycoprotéinoses
  - Maladies de surcharge lipidique
- Défauts de modification post-traductionnelle
- Troubles des protéines membranaires intégrales
- Céroïdes lipofuscinoses neuronales
- Troubles des LRO (*lysosome-related organelles*)

Ce sont des pathologies avec une grande hétérogénéité génétique et phénotypique (**Figure 25**).

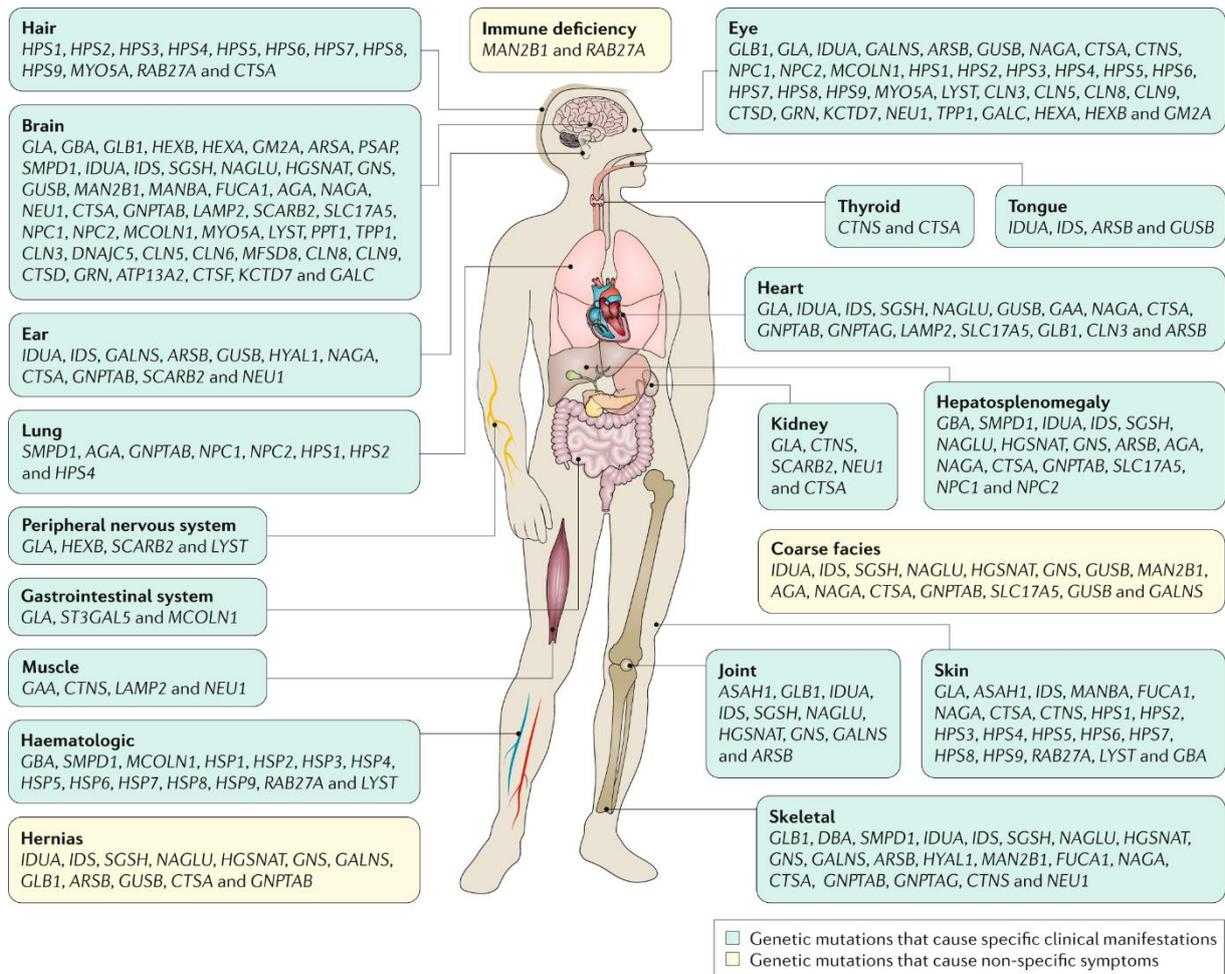


Figure 25. Organes affectés dans les maladies lysosomales.

Malgré une implication neurologique importante dans de nombreuses ML, l'atteinte de plusieurs autres organes est fréquente. Les cases bleues se rapportent à des organes spécifiques, tandis que les cases jaunes reflètent des symptômes qui ne sont pas spécifiques à un organe.<sup>200</sup>

## 2. Diagnostic

Le diagnostic de la plupart des ML est simple lorsqu'elles sont suspectées sur la base de la présentation clinique. Cependant, le diagnostic de ML n'est souvent pas suspecté cliniquement du fait de la non-spécificité des symptômes, notamment chez l'adulte, et/ou de leur rareté. Une stagnation et/ou une régression des acquisitions après une période de développement psychomoteur chez un enfant entre 6 mois et 10 ans doivent faire évoquer une maladie lysosomale et un bilan spécialisé devrait être initié.

En fonction de l'orientation clinique, le bilan initial peut comporter un phénotypage biochimique à la recherche notamment du substrat accumulé (glycosaminoglycanes urinaires dans les mucopolysaccharidoses par exemple) ou d'autres biomarqueurs associés aux ML et/ou des dosages enzymatiques, sur leucocytes ou taches de sang séché. L'analyse moléculaire des gènes impliqués dans les ML permettra de confirmer une pathologie détectée par le bilan biochimique ou permettra d'élargir

le champ d'investigation aux maladies sans test biochimique. Ce schéma diagnostique habituel est parfois considéré comme peu efficace car séquentiel et certaines équipes tendent vers une approche moléculaire d'emblée avec un bilan biochimique secondaire permettant de confirmer ou d'aider à l'interprétation des résultats de la génétique. Les nouvelles technologies permettent la recherche de nouveaux biomarqueurs et une caractérisation plus fine de la pathologie (**Figure 26**).

Un diagnostic rapide est primordial : si de nombreuses ML disposent d'un traitement spécifique, celui-ci n'est souvent efficace que lorsqu'il est initié tôt dans le cours de la maladie.

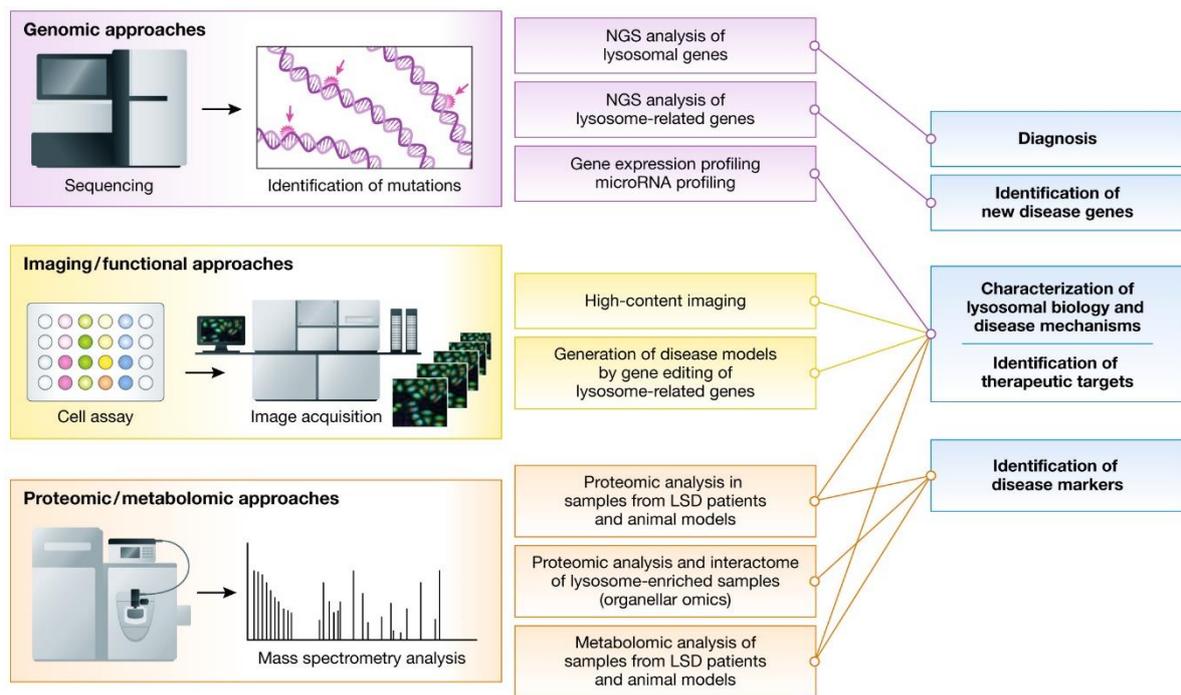


Figure 26. Nouvelles technologies pour étudier les ML.

De nouvelles technologies, dans la plupart des cas basées sur des techniques à haut débit combinées à l'analyse bioinformatique, ont été exploitées pour le bilan diagnostique chez les patients suspects de ML, pour l'identification de nouveaux gènes liés à des pathologies, pour la recherche de biomarqueurs de la maladie, pour la caractérisation de la biologie des lysosomes et des mécanismes de la maladie, ainsi que pour l'identification et la validation de nouvelles cibles thérapeutiques.<sup>195</sup>

### 3. Dépistage et prévention

#### a) Dépistage des porteurs

Dans certaines populations, la fréquence des porteurs pour certaines ML est particulièrement élevée du fait d'un effet fondateur ou d'un effet *bottleneck* avec comme conséquence une incidence élevée de la pathologie (voir **Tableau 3** ci-dessus). Un dépistage des porteurs de certaines de ces maladies est organisé. On peut citer comme exemples la maladie de Tay-Sachs chez les juifs ashkénazes aux Etats-

Unis ou encore l'aspartylglucosaminurie en Finlande<sup>204,205</sup>. Ces programmes permettent d'informer les couples sur leur risque d'avoir un enfant atteint et de leur proposer un recours aux techniques de procréation médicalement assistée (PMA) ou encore au diagnostic prénatal.

#### *b) Dépistage néonatal*

L'objectif du dépistage néonatal est de diagnostiquer des pathologies mettant en jeu le pronostic vital ou fonctionnel d'un enfant avant que celles-ci ne soient symptomatiques, et ainsi d'améliorer la santé globale d'une population. En effet, la surveillance et la prise en charge de patients dépistés tôt permettent de mettre en place précocement les traitements spécifiques et les soins de support et d'améliorer la qualité de vie. Il nécessite non seulement un test de détection fiable, mais également une éducation parentale, un suivi clinique et des traitements disponibles pour tous les nouveau-nés positifs. Si certaines maladies font consensus en termes de dépistage néonatal, d'autres sont débattues et la liste des maladies dépistées varie de manière significative d'un pays à un autre. En raison de l'avènement de traitements efficaces et de techniques haut débit par spectrométrie de masse pour la recherche de déficits enzymatiques, le dépistage néonatal des maladies lysosomales commence à se mettre en place dans le monde. À Taïwan, la maladie de Fabry et de la maladie de Pompe sont intégrées au dépistage néonatal national<sup>206,207</sup>. Aux États-Unis, la maladie de Pompe et les mucopolysaccharidoses de type I et II sont incluses dans le panel minimum recommandé (**voir 2**). Dans certains Etats, des ML additionnelles sont dépistées : les maladies de Fabry, Gaucher et Krabbe en Pennsylvanie ; Fabry, Gaucher, Krabbe et Niemann-Pick type A/B dans l'Illinois (<https://newbornscreening.hrsa.gov/your-state>). En Europe, la mucopolysaccharidose de type 1 a été incluse dans le programme de dépistage national néerlandais en 2021, les maladies de Pompe, Fabry, Gaucher et la MPSI sont dépistées dans certaines régions italiennes, et des études pilotes ont été réalisées ou sont en cours, notamment en Normandie pour 13 maladies lysosomales (NCT04393701)<sup>208,209</sup>.

Cependant, le développement de nouvelles analyses est nécessaire. En effet, certains variants bénins, parfois fréquents, entraînent un pseudo-déficit enzymatique avec une diminution de l'activité *in vitro* et un taux de faux-positif important<sup>210,211</sup>.

### c) *Diagnostic prénatal et prévention*

Dans les familles ayant déjà un enfant atteint d'une maladie lysosomale avec un diagnostic moléculaire confirmé, un diagnostic prénatal peut être proposé, ainsi que, comme pour le dépistage des porteurs, un recours à la PMA, notamment le diagnostic pré-implantatoire.

## V. *Prise en charge*

Un certain nombre de maladies lysosomales disposent d'un ou plusieurs traitements spécifiques. Ces traitements sont principalement des enzymothérapies substitutives, des molécules chaperonnes et des thérapies de réduction de substrat.

### 1. *L'enzymothérapie substitutive*

L'enzymothérapie substitutive (ERT) est basée sur la capacité des cellules à absorber des macromolécules, comme les enzymes, par endocytose médiée par les récepteurs et qui peuvent être adressées au lysosome par fusion endosome-lysosome<sup>212</sup>. Ceci est rendu possible par des modifications équivalentes aux modifications post-traductionnelles de l'enzyme recombinante produite, par ajout de résidus glucidiques notamment (**Figure 27**).

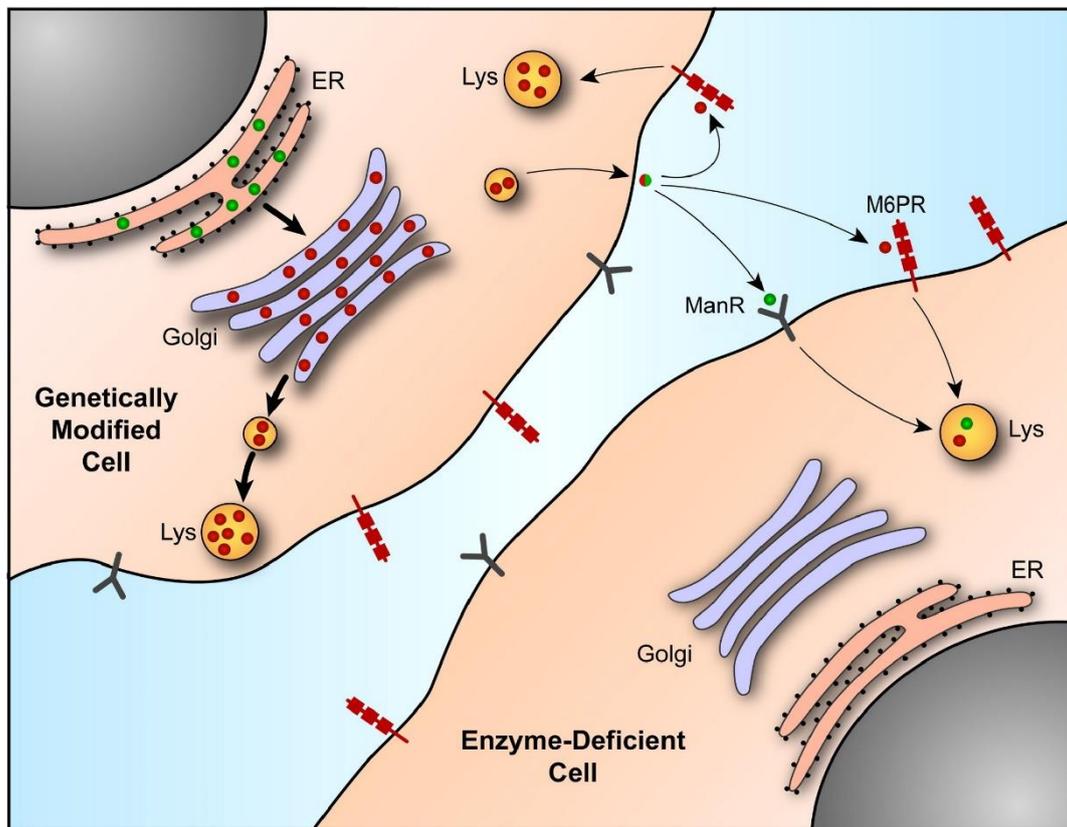


Figure 27. Correction croisée des enzymes lysosomales.<sup>213</sup>

Les enzymes lysosomales marquées au M6P (cercles rouges) peuvent être sécrétées et endocytées par les cellules environnantes grâce aux M6PR exprimés à la membrane plasmique. C'est sur ce principe (« cross-correction ») que reposent les traitements par enzymothérapie substitutive, par transplantation de cellules souches hématopoïétiques et par thérapie génique dans les maladies lysosomales. Sa découverte est le fruit du hasard et d'une erreur de laboratoire avec la correction du phénotype de cellules de patients Hurler (MPSI) et Hunter (MPSII) mélangées par erreur<sup>214</sup>.

Si ces ERT sont très efficaces dans certaines pathologies et sur certains symptômes, permettant de modifier le pronostic fonctionnel, voire vital, des patients et d'améliorer leur qualité de vie, elles présentent de nombreuses limites :

- Tous les organes ne sont pas accessibles à l'enzyme recombinante : les atteintes squelettiques, oculaires et cardiovasculaires n'y sont pas ou peu sensibles, de même que le système nerveux central, l'enzyme ne traversant pas la barrière hémato-encéphalique. Pour certaines maladies avec expression neurologique, des méthodes d'administration intracérébroventriculaire ou intrathécale peuvent être proposées, comme c'est le cas pour le CLN2<sup>215</sup> (**Tableau 4**).
- L'enzyme a une demi-vie courte et doit être administrée à intervalle régulier (hebdomadaire, bihebdomadaire ou mensuelle), au cours de perfusions souvent longues (plusieurs heures). Les contraintes peuvent être réduites dans certains cas par une administration au domicile du patient. Mais l'ERT reste un traitement lourd et n'est pas adapté aux patients avec troubles du comportement.

- Chez les patients dont les variants entraînent une absence de protéine produite, la production d'anticorps dirigés contre l'enzyme peut réduire l'efficacité du traitement et provoquer des effets indésirables, notamment l'anaphylaxie<sup>216</sup>.
- C'est un traitement coûteux, dont le prix augmente avec l'âge du patient, les doses administrées étant dépendantes du poids<sup>217</sup>. Il n'est donc pas disponible dans tous les pays et l'indication doit être discutée par des spécialistes de manière collégiale. Il en va de même pour la poursuite et l'arrêt du traitement.

## 2. Les thérapies de réduction de substrat

Les thérapies de réduction de substrat (*substrate reduction therapy*, SRT) utilisent de petites molécules pour inhiber la biosynthèse des métabolites stockés ou bien favoriser leur élimination par d'autres voies. Le miglustat par exemple, utilisé dans la maladie de Gaucher et la maladie de Niemann-Pick de type C inhibe l'activité de la glucosylcéramide (GlcCer) synthase, enzyme qui catalyse la première étape de la biosynthèse des glycosphingolipides<sup>218,219</sup>. Les SRT sont administrées par voie orale et sont stables à température ambiante et donc plus facile à conserver et à utiliser que les ERT. De plus, en raison de leur petite taille, elles ne sont pas immunogènes et certaines peuvent traverser la barrière hémato-encéphalique. L'apparition du bénéfice clinique est cependant plus longue que dans l'ERT et les molécules de SRT ont des effets indésirables ou des complications liées au métabolisme des médicaments. Ce sont également des traitements chers avec un accès limité. En principe, la SRT pourrait être développée pour toutes les ML mais est actuellement limitée aux glycosphingolipidoses car les inhibiteurs biosynthétiques spécifiques à cette voie ont été les premiers identifiés.

## 3. Les molécules chaperonnes

De nombreux variants pathogènes dans les gènes codant pour les enzymes lysosomales entraînent une anomalie de repliement de la protéine qui est alors instable ou avec une activité catalytique réduite<sup>220</sup>. Des inhibiteurs du site actif, à des doses sous-inhibitrices, peuvent stabiliser l'enzyme mutante, prolongeant sa demi-vie et améliorant ses capacités catalytiques. Ces molécules chaperonnes sont administrées par voie orale et certaines peuvent traverser la barrière hémato-encéphalique. Comme pour les autres molécules, ce sont des traitements coûteux.

Tableau 4. Thérapies spécifiques approuvées pour les ML (liste non exhaustive). D'après<sup>200</sup>

Maladie	Type de thérapie	Nom du médicament	Commentaires
<b>Maladie de Gaucher</b>	Enzymothérapie substitutive	- Imiglucérase - Velaglucérase alfa - Taliglucérase alfa	L'ERT n'est efficace que pour la maladie de Gaucher de type I (le phénotype non neuropathique) et n'est pas efficace pour les types II et III (phénotypes neuropathiques)
	Thérapie de réduction de substrat	- Miglustat - Eliglustat	Efficace uniquement pour la maladie de Gaucher non neuropathique
<b>Maladie de Fabry</b>	Enzymothérapie substitutive	- Agalsidase beta - Agalsidase alfa - Pegunigalsidase alfa	Les agalsidases alfa et beta ont la même composition en acides aminés mais une glycosylation différente Pegunigalsidase alfa est une enzyme d'origine végétale pégylée
	Molécule chaperonne	Migalastat	Efficace sur certains variants uniquement
<b>Maladie de Pompe</b>	Enzymothérapie substitutive	Alpha alglucosidase	Inverse les anomalies cardiaques mais pas les anomalies des muscles squelettiques
<b>MPS I (Hurler-Scheie et Scheie)</b>	Enzymothérapie substitutive	Laronidase	Efficace dans les formes atténuées mais pas dans la forme sévère (Hurler)
<b>MPS II (Hunter)</b>	Enzymothérapie substitutive	- Idursulfase - Idursulfase beta	Non efficace sur le SNC et les atteintes squelettiques
<b>MPS IVA (Morquio A)</b>	Enzymothérapie substitutive	Elosulfase	Non efficace sur les atteintes squelettiques, bénéfice mis en question
<b>MPS VI (Maroteaux-Lamy)</b>	Enzymothérapie substitutive	Galsulfase	L'efficacité est variable et dépend de la gravité de la maladie et de l'âge auquel l'ERT a été commencée
<b>MPS VII (Sly)</b>	Enzymothérapie substitutive	Vestronidase alfa	Approuvé pour une utilisation chez les patients pédiatriques et adultes
<b>Déficit en lipase acide lysosomale (maladie de Wolman, CESD)</b>	Enzymothérapie substitutive	Sebelipase alfa	Réduction des anomalies lipidiques multiples liées à la maladie
<b>Lipofuscinose céréoïde neuronale infantile tardive de type 2 (CLN2)</b>	Enzyme recombinante	Cerliponase alfa	Premier traitement disponible pour toute forme de maladie de Batten ; nécessite une administration intracérébroventriculaire
<b>Maladie de Niemann-Pick de type C</b>	Thérapie de réduction de substrat	Miglustat	Première petite molécule agissant sur la pathologie du SNC dans une ML

#### 4. La greffe de cellules souches hématopoïétiques

Certaines maladies lysosomales avec atteintes du système nerveux central sont accessibles à la greffe de moelle osseuse. Le rationnel est que la greffe fournit une source durable de cellules dérivées de la moelle osseuse, en particulier les cellules de la microglie, permettant de traiter les autres cellules du système nerveux central grâce à l'exocytose puis l'endocytose des enzymes reconnues par le M6PR.

C'est notamment le traitement de référence chez les patients atteints de la forme sévère de mucopolysaccharidose de type I (syndrome de Hurler) à condition que le diagnostic et la greffe soient réalisés précocement<sup>221</sup>. L'enzymothérapie peut alors être utilisée comme traitement adjuvant, en attendant la réalisation de la greffe. Cette approche est également utilisée dans la leucodystrophie métachromatique et la maladie de Krabbe. Elle n'est cependant pas indiquée dans toutes les pathologies avec atteintes du système nerveux central (SNC), avec la dégradation du phénotype neurologique post-greffe dans certaines maladies comme l'aspartylglucosaminurie.

## 5. Les soins de support

La plupart des ML ne peuvent pas être traitées et sont prises en charge de manière symptomatique par une équipe pluridisciplinaire médicale et paramédicale. Ces soins de supports améliorent le confort et la qualité de vie du patient et de sa famille.

Même lorsqu'aucun traitement spécifique n'est disponible, un diagnostic précoce reste indispensable : il permet de réduire l'errance diagnostique, de fournir un pronostic et une information aux parents sur l'évolution de la maladie. Les parents peuvent également bénéficier du soutien des associations de patients. Tous ces éléments permettent d'améliorer de manière considérable la qualité de vie du patient et de sa famille<sup>222,223</sup>.

## 6. Les perspectives

D'importants progrès ont été réalisés dans la recherche sur les LD et de nombreux essais cliniques au cours des deux dernières décennies ont abouti au développement de thérapies approuvées par la FDA et/ou l'EMA qui ont amélioré la qualité de vie et la survie des patients. Cependant, la majorité des ML restent sans traitement efficace, en particulier ceux avec une atteinte du SNC. Ainsi, d'importants efforts de recherche sont en cours pour développer de nouvelles générations de thérapies, notamment ciblant efficacement le cerveau.

L'étude des ML a conduit à une bien meilleure compréhension de la biologie fondamentale des lysosomes et a révélé que le lysosome est un centre de signalisation très complexe en plus de son rôle de centre catabolique et de recyclage de la cellule. L'intégration de la fonction lysosomale avec d'autres aspects du métabolisme cellulaire détient probablement la clé de l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques (**Figure 28**).

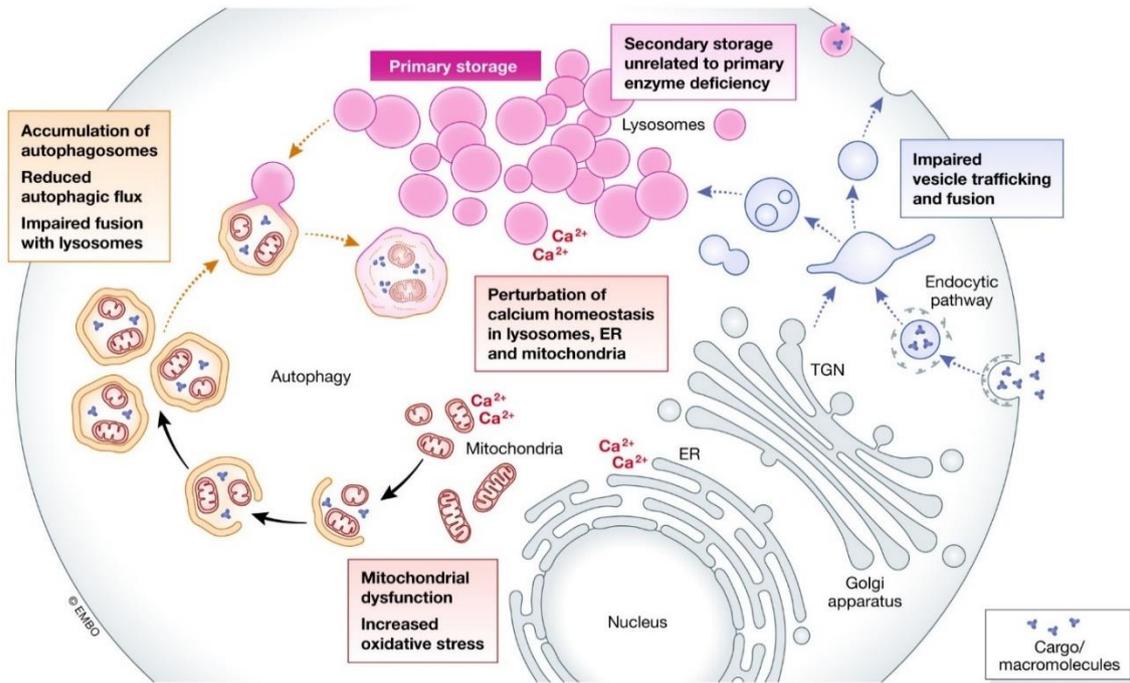


Figure 28. Les mécanismes impliqués dans la physiopathologie des ML.

L'accumulation de substrats non dégradés déclenche de multiples événements qui apparaissent aujourd'hui comme des acteurs importants dans la pathogénèse des ML. Ces événements comprennent le stockage de substrats secondaires non liés à l'enzyme déficiente, une composition anormale des membranes et la fusion et le trafic intracellulaire aberrants des vésicules ; l'altération de l'autophagie, la perturbation de l'homéostasie calcique et le dysfonctionnement mitochondrial et stress oxydatif ; la dysrégulation des voies de signalisation et l'activation de l'inflammation (non représenté ici).<sup>195</sup>

#### a) Nouvelles approches thérapeutiques

De nouvelles approches thérapeutiques sont également en développement notamment dans l'espoir de relever le défi du passage de la barrière hémato-encéphalique. Ces nouvelles approches comprennent :

- La stabilisation de l'enzyme :
  - Les modificateurs de protéase qui exploitent la machinerie cellulaire afin de prolonger la durée de vie des protéines mutantes et qui pourraient être applicables à plusieurs ML<sup>224</sup>
  - Les oligonucléotides anti-sens (*anti-sens oligonucleotides*, ASO) avec une approche similaire à la SRT
- La modification de l'expression du gène :
  - Les *STOP codon readthrough drugs* qui permettent à la machinerie de traduction de continuer à traduire l'ARN messager en polypeptide au-delà d'un codon STOP prématuré, le remplaçant par un acide aminé<sup>225</sup>
  - Les thérapies géniques *in vivo* et *ex vivo*

- Les techniques d'édition du génome
- Le repositionnement de médicaments déjà existant<sup>226</sup>
- Les traitements anti-inflammatoires

#### *b) Les défis de la conception des essais cliniques*

Les ML sont individuellement rares et pour beaucoup, leur histoire naturelle n'est pas bien caractérisée. Les obstacles à l'approbation de nouvelles thérapies sont nombreux. La rareté des pathologies entraîne des difficultés quant au recrutement d'un nombre suffisant de patients afin d'obtenir des conclusions statistiquement significatives. La conception d'un essai clinique avec la détermination de critères de jugement pertinents quant à l'efficacité du traitement pose également question. De plus, le délai entre l'apparition des symptômes et le diagnostic est souvent long, la progression de la maladie est variable même au sein d'un même sous-type voire au sein d'une même famille. Il est donc difficile de recruter des populations de patients homogènes et de différencier les effets du traitement de l'évolution naturelle de la pathologie.

Les essais cliniques pour les maladies rares sont par définition de petite taille et souvent de faible puissance, et ceci est aggravé par l'hétérogénéité clinique. Les efforts pour améliorer la situation comprennent la création de registres de patients, une sensibilisation accrue pour réduire le délai de diagnostic et l'amélioration de la conception des essais cliniques lorsque cela est possible, en prenant en compte également des critères qualitatifs tels que l'amélioration de la qualité de vie des patients et de leur famille.

*Tableau 5. Maladies lysosomales et des organelles associées aux lysosomes*

*BLOC: biogenesis of lysosome-related organelles complex; CNS: central nervous system; CT: chaperone therapy; ER: endoplasmic reticulum; ERT: enzyme replacement therapy; GM1: GM1-ganglioside; HSCT: hematopoietic stem cell therapy; INCL: infantile neuronal ceroid lipofuscinosis; ISSD: infantile sialic acid storage disease; LAMP1: lysosome-associated membrane glycoprotein 1; LROs: lysosome-related organelles; N/A: not applicable; PARK9: Parkinson disease 9; SMT: small-molecule therapy; SRT: substrate reduction therapy; S/S: symptomatic and supportive therapy. <sup>a</sup>Denotes enzyme deficiency disorders. <sup>b</sup>Denotes diseases that involve the CNS. <sup>c</sup>Denotes disorders with severe and attenuated forms. Presenting signs and symptoms taken from GeneReviews and Genetics Home Reference. D'après<sup>200</sup>*

Disease (gene)	Onset	Primary defect (Substrate/product)	Presenting symptoms	Approved therapies
<b>Sphingolipidoses<sup>a</sup></b>				
<b>Fabry disease (GLA)</b>	Juvenile (males) or adult (females) or non-classical adult (males)	$\alpha$ -Galactosidase A (Globotriaosylceramide)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Acroparesthesias, gastroenteritis, nephropathy, angiokeratoma in a bathing suit distribution; cerebrovascular disease, stroke, corneal opacities (males): corneal verticillata, acroparesthesias, cerebrovascular disease and stroke (females)</li> <li>• Left ventricular hypertrophy, cardiomyopathy and arrhythmia; proteinuria or end-stage renal disease without other classical symptoms; or cerebrovascular disease with stroke or transient ischaemic attacks. Left ventricular hypertrophy might be the only manifestation in some cases (males or females)</li> </ul>	ERT and CT
<b>Farber lipogranulomatosis (ASAH1)</b>	Juvenile	Acid ceramidase (Ceramide)	Polyarticular arthritis, joint contractures, subcutaneous nodules, hoarse voice and cherry-red macula	S/S
<b>Gaucher disease: type I, type II<sup>b</sup>, type III<sup>b</sup> and perinatal lethal form<sup>b</sup> (GBA)</b>	Juvenile to adult (type I), infantile (type II), juvenile (type III) and perinatal lethal (perinatal lethal form)	$\beta$ Glucocerebrosidase, also known as $\beta$ -glucosidase (Glucocerebroside and glucosylsphingosine)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Type I: hepatosplenomegaly, pancytopenia, bone disease, degenerative arthritis and elevated risk of multiple myeloma (can also be asymptomatic)</li> <li>• Type II: limited psychomotor development, bulbar signs including stridor and swallowing difficulty, stiffened opisthotonic posture, spasticity and trismus, epilepsy</li> <li>• Type III: oculomotor apraxia, abnormal horizontal saccadic eye movements and myoclonic or generalized epilepsy</li> </ul>	ERT and SRT (types I, II and III), none (perinatal lethal form)

			<ul style="list-style-type: none"> <li>• Perinatal lethal form: hepatosplenomegaly, pancytopenia, skin abnormalities and non-immune hydrops fetalis</li> </ul>	
<b>GM1 gangliosidosis: type I<sup>b</sup>, type II<sup>b</sup> and type III<sup>b</sup> (GLB1)</b>	Infantile (type I), late infantile to juvenile (type II) and adult (type III)	$\beta$ -Galactosidase (GM1 ganglioside, keratan sulfate and oligosaccharides)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Type I: hypotonia, developmental regression by 6 months, seizures, cherry-red macula and severe gross motor decline</li> <li>• Type II: dysarthria progressing to absent speech, ataxia progressing to loss of ambulation, progressive cognitive decline and dysostosis multiplex (variable)</li> <li>• Type III: ataxia, dystonia, dysarthria and parkinsonism</li> </ul>	S/S
<b>GM2 gangliosidosis, Tay–Sachs disease<sup>b</sup> (HEXA)</b>	Infantile, juvenile and adult	$\beta$ -Hexosaminidase (GM2 ganglioside, glycosphingolipids and oligosaccharides)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infantile: hypotonia, developmental regression before age 1 year, macrocephaly, seizures and cherry-red macula</li> <li>• Juvenile: progressive developmental regression in early childhood, cerebellar ataxia and dysarthria</li> <li>• Adult: cerebellar ataxia and frequent falls beginning in teens or twenties, dysarthria and psychosis</li> </ul>	S/S
<b>GM2 gangliosidosis, Sandhoff disease<sup>b</sup> (HEXB)</b>	Infantile, juvenile and adult	$\beta$ -Hexosaminidase (GM2 ganglioside, GA2 glycolipid and oligosaccharides)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infantile: hypotonia, developmental regression before age 1 year, macrocephaly, seizures and cherry-red macula</li> <li>• Juvenile: progressive developmental regression in early childhood, cerebellar ataxia, dysarthria and sensory neuropathy</li> <li>• Adult: cerebellar ataxia and frequent falls beginning in teens or twenties, dysarthria and psychosis sensorineuropathy</li> </ul>	S/S
<b>GM2 gangliosidosis, GM2 activator deficiency<sup>b</sup> (GM2A)</b>	Infantile	GM2 ganglioside activator (GM2 ganglioside and glycosphingolipids)	Hypotonia, developmental regression, macrocephaly, seizures and cherry-red macula	S/S

<b>Globoid cell leukodystrophy, also known as Krabbe disease<sup>b</sup> (GALC)</b>	Infantile and juvenile	Galactosylceramidase (Galactocerebroside and psychosine)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infantile: irritability, hypotonia, spasticity, feeding difficulties and psychomotor regression</li> <li>• Juvenile: variable onset and progression from childhood to adulthood, muscle weakness, vision loss and intellectual regression</li> </ul>	HSCT (infantile onset) and S/S
<b>Metachromatic leukodystrophy<sup>b</sup> (ARSA and PSAP)</b>	Late infantile, juvenile and adult	Arylsulfatase A and prosaposin (Sulfatides)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Late infantile: ataxia, weakness, loss of speech and cherry-red macula</li> <li>• Juvenile: behavioural problems and psychomotor regression</li> <li>• Adult: behavioural problems, psychiatric symptoms and cognitive decline</li> </ul>	HSCT
<b>Niemann–Pick disease types A<sup>b</sup> and B (SMPD1)</b>	Infantile (type A) and juvenile (type B)	Sphingomyelin phosphodiesterase (Sphingomyelin)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infantile: hepatosplenomegaly, failure to thrive, psychomotor regression, interstitial lung disease and cherry-red macula</li> <li>• Juvenile: hepatosplenomegaly, recurrent pulmonary infections, thrombocytopenia, short stature and neurological impairment</li> </ul>	S/S
<b>Mucopolysaccharidoses<sup>a</sup></b>				
<b>MPS I: Hurler syndrome<sup>b</sup>, Hurler–Scheie syndrome and Scheie syndrome (IDUA)</b>	Infantile (Hurler) and juvenile (Hurler–Scheie and Scheie)	$\alpha$ -L-Iduronidase (Dermatan sulfate and heparan sulfate)	Coarse facial features, hepatosplenomegaly, hernias, corneal clouding, frequent otitis media, cognitive decline (except attenuated forms) and dysostosis multiplex	HSCT (Hurler) and ERT (Hurler–Scheie and Scheie)
<b>MPS II, also known as Hunter syndrome<sup>b,c</sup> (IDS)</b>	Infantile, juvenile (acute) and juvenile (attenuated)	Iduronate 2-sulfatase (Dermatan sulfate and heparan sulfate)	Coarse facial features, hepatosplenomegaly, dermal pebbling, frequent otitis media, hernias, no corneal clouding, spinal stenosis and dysostosis multiplex	ERT
<b>MPS IIIA, also known as Sanfilippo syndrome A<sup>b,c</sup> (SGSH)</b>	Late infantile	N-Sulfoglucosamine sulfohydrolase (Heparan sulfate)	Behavioural difficulties, sleep disturbance, progressive intellectual disability, coarse facial features, macrocephaly,	S/S

			hepatosplenomegaly, hernias and mild dysostosis multiplex	
<b>MPS IIIB, also known as Sanfilippo syndrome B<sup>b,c</sup> (NAGLU)</b>	Juvenile	N-Acetyl- $\alpha$ -glucosaminidase (Heparan sulfate)	Similar to MPS IIIA	S/S
<b>MPS IIIC, also known as Sanfilippo syndrome C<sup>b,c</sup> (HGSNAT)</b>	Juvenile	Heparan- $\alpha$ -glucosaminide-N-acetyltransferase (Heparan sulfate)	Similar to MPS IIIA	S/S
<b>MPS IIID, also known as Sanfilippo syndrome D<sup>b,c</sup> (GNS)</b>	Juvenile	N-acetylglucosamine-6-sulfatase (Heparan sulfate)	Similar to MPS IIIA	S/S
<b>MPS IVA, also known as Morquio syndrome A (GALNS)</b>	Late infantile	N-acetylgalactosamine-6-sulfatase (Keratan sulfate and chondroitin 6-sulfate)	Short stature, severe skeletal dysplasia, hyperextensible joints, odontoid hypoplasia, corneal clouding and hernias	ERT
<b>MPS IVB, also known as Morquio syndrome B (GLB1)</b>	Late infantile and juvenile	$\beta$ -Galactosidase (Keratan sulfate)	Similar to MPS IVA	S/S
<b>MPS VI, also known as Maroteaux–Lamy syndrome (ARSB)</b>	Late infantile and juvenile	Arylsulfatase B (Dermatan sulfate)	Skeletal dysplasia, short stature, contractures, macrocephaly, hernias, macroglossia, hepatosplenomegaly, sleep apnoea and corneal clouding	ERT
<b>MPS VII, also known as Sly disease<sup>b</sup> (GUSB)</b>	Infantile and late infantile	$\beta$ -Glucuronidase (Dermatan sulfate, heparan sulfate and chondroitin 6-sulfate)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infantile: hydrops fetalis</li> <li>• Late infantile: macrocephaly, hydrocephalus, coarse facial features, macroglossia, hepatosplenomegaly, heart valve abnormalities, hernias, corneal clouding, recurrent otitis media, progressive intellectual disability but not in all patients (late infantile)</li> </ul>	ERT
<b>MPS IX (HYAL1)</b>	Juvenile	Hyaluronidase 1 (Hyaluronan)	Periarticular soft tissue masses, mild short stature, acetabular erosion and recurrent otitis media	S/S
<b>Glycogen storage disease (GSD)<sup>a</sup></b>				
<b>GSD II, also known as Pompe disease (GAA)</b>	Infantile <sup>b</sup> and adult	Lysosomal $\alpha$ -glucosidase, also known as acid maltase (Glycogen)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infantile: cardiomegaly and severe hypotonia.</li> </ul>	ERT

			• Adult: muscle weakness and atrophy, including of the diaphragm	
<b>Glycoproteinoses<sup>a</sup></b>				
<b>α-Mannosidosis<sup>b</sup>: type I mild, type II moderate and type III severe (MAN2B1)</b>	Infantile and juvenile	Lysosomal α-mannosidase (Mannose-rich oligosaccharides)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Type I: mild skeletal deformities and cognitive impairment</li> <li>• Type II: dysmorphic facial features, immune deficiency, dysostosis multiplex, ataxia and progressive cognitive impairment</li> <li>• Type III: severe skeletal abnormalities in early infancy, progressive psychomotor deterioration</li> </ul>	ERT
<b>β-Mannosidosis<sup>b</sup> (MANBA)</b>	Juvenile and adult	β-Mannosidase (Man(β1>4)N-acetylglucosamine)	Intellectual disability and speech impairment, angiokeratoma, hypotonia, behavioural disturbance	S/S
<b>Fucosidosis<sup>b</sup> (FUCA1)</b>	Infantile, late infantile and juvenile	α-L-Fucosidase (Fucose-rich oligosaccharides, glycoproteins and glycolipids)	Clinical spectrum ranging from severe neurological deterioration and death in childhood to milder psychomotor deterioration, angiokeratoma, anhidrosis and dysostosis multiplex	S/S
<b>Aspartylglucosaminuria<sup>b</sup> (AGA)</b>	Juvenile	Aspartoglucosaminidase (Aspartylglucosamine)	Progressive intellectual disability, dysmorphic facial features, recurrent respiratory infections, hepatomegaly, diarrhoea, mild dysostosis multiplex, seizures and movement disorder into adulthood	S/S
<b>Schindler disease: type I<sup>b</sup>, also known as infantile-onset neuroaxonal dystrophy, type II<sup>b</sup> also known as Kanzaki disease, and type III<sup>b</sup>, intermediate severity (NAGA)</b>	Infantile (type I), adult (type II) and juvenile (type III)	α-N-Acetyl-galactosaminidase (Sialylated or asialo glycopeptides and glycosphingolipids)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Type I: rapid psychomotor deterioration and seizures</li> <li>• Type II: mild cognitive impairment, sensorineural hearing loss and angiokeratomas</li> <li>• Type III: developmental delay, seizures, cardiomyopathy, hepatomegaly and autism spectrum disorder</li> </ul>	S/S
<b>Sialidosis type I, also known as cherry-red spot myoclonus syndrome (NEU1)</b>	Adult	Neuraminidase-1 (Sialylated oligosaccharides and glycopeptides)	Gait disturbance and ataxia due to myoclonus, reduced visual acuity, cherry-red macula, seizures and preserved cognition	S/S

<b>Sialidosis type II, also known as mucopolidosis I<sup>b</sup> (NEU1)</b>	Congenital, infantile and juvenile	Neuraminidase-1 (Sialylated oligosaccharides and glycopeptides, LAMP1 and amyloid precursor protein)	Hydrops fetalis, neonatal ascites, hepatosplenomegaly, spectrum of intellectual disability, dysostosis multiplex, coarse facial features, short stature, hearing loss, hypotonia, gingival hyperplasia, flat nasal widely spaced teeth, cherry-red macula, myoclonus, ataxia, tremor and angiokeratoma	S/S
<b>Galactosialidosis (CTSA)</b>	Early infantile, late infantile, juvenile or adult	Protective protein cathepsin A, and a secondary deficiency in $\beta$ -galactosidase and neuraminidase-1 (Sialylated oligosaccharides and glycopeptides, LAMP2 and bioactive peptides)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Early infantile: hydrops fetalis, inguinal hernia, hepatosplenomegaly, dysostosis multiplex, coarse facial features, cardiomegaly, cherry-red macula, renal disease</li> <li>• Late infantile: short stature, dysostosis multiplex, cardiac valve abnormalities, hepatosplenomegaly, coarse facial features, mild or no intellectual disability, hearing loss and cherry-red macula</li> <li>• Juvenile or adult: ataxia, myoclonus, seizures, progressive intellectual disability, angiokeratomas, spinal anomalies, vision and hearing loss</li> </ul>	S/S
<b><i>Lipid storage diseases</i></b>				
<b>Acid lipase deficiency: Wolman disease<sup>b</sup> and cholesterol ester storage disease (LIPA)</b>	Infantile, juvenile and adult	Lysosomal acid lipase/cholesteryl ester hydrolase (Cholesteryl esters, triglycerides and other lipids)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infantile: hepatosplenomegaly, jaundice, failure to thrive, vomiting, diarrhoea, malabsorption, calcification of the adrenal glands, anaemia, developmental delay and multiorgan failure</li> <li>• Juvenile and adult: hepatosplenomegaly, liver fibrosis, malabsorption, high cholesterol levels and atherosclerosis at an early age with increased risk of heart attack or stroke</li> </ul>	ERT
<b><i>Post-translational modification defects</i></b>				

<b>Multiple sulfatase deficiency (SUMF1)</b>	Infantile, late infantile and juvenile	Formylglycine-generating enzyme (Sulfatides)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infantile: seizures, severe psychomotor retardation, coarse facial features, ichthyosis, hypertrichosis, dysostosis multiplex and hepatosplenomegaly</li> <li>• Late infantile: normal early development followed by developmental plateau then regression, ichthyosis, dysostosis multiplex and coarse facial features</li> <li>• Juvenile: typical until middle to late childhood then plateau and psychomotor regression over a prolonged period and ichthyosis</li> </ul>	S/S
<b>Mucopolidosis II <math>\alpha/\beta</math>, I-cell disease<sup>b</sup> (GNPTAB)</b>	Infantile	<i>N</i> -Acetylglucosamine-1-phosphotransferase subunits $\alpha/\beta$ (Oligosaccharides, glycosaminoglycans and glycosphingolipids)	Growth deficiency beginning at birth, coarse facial features, gingival hypertrophy, recurrent otitis media, cardiac valvular disease, recurrent pneumonia, hernias, severe psychomotor retardation, hepatosplenomegaly and severe dysostosis multiplex with kyphosis, clubfoot and joint deformity	S/S
<b>Mucopolidosis II <math>\alpha/\beta</math>, pseudo-Hurler polydystrophy (GNPTAB)</b>	Late infantile or juvenile	<i>N</i> -Acetylglucosamine-1-phosphotransferase subunits $\alpha/\beta$ (Oligosaccharides, glycosaminoglycans and glycosphingolipids)	Short stature, dysostosis multiplex, joint contractures, variable intellectual disability, thickened skin and restrictive lung disease	S/S
<b>Mucopolidosis III <math>\gamma</math>, variant pseudo-Hurler polydystrophy (GNPTG)</b>	Juvenile or adult	<i>N</i> -Acetylglucosamine-1-phosphotransferase subunit $\gamma$ (Oligosaccharides, glycosaminoglycans and glycosphingolipids)	Short stature, aortic valve abnormalities, dysostosis multiplex and normal to near-normal intelligence	S/S
<b>Integral membrane protein disorders</b>				
<b>Cystinosis (CTNS)</b>	Infantile or juvenile	Cystinosis (Cystine)	Renal tubular Fanconi syndrome, renal failure, failure to thrive, photophobia, corneal	SMT

			crystals, hypophosphataemic rickets, light pigmentation, heat intolerance, primary hypothyroidism and myopathy	
<b>Danon disease<sup>b</sup> (<i>LAMP2</i>)</b>	Juvenile or adult and sex-linked dominant	LAMP2 (Cytoplasmic debris and glycogen)	Cardiomyopathy, myopathy, intellectual disability with males more severely affected than females and cardiac arrhythmia	S/S
<b>Action myoclonus-renal failure syndrome<sup>b</sup> (<i>SCARB2</i>)</b>	Adult	Lysosomal integral membrane protein (Unknown)	Tremor, action myoclonus, peripheral neuropathy, sensorineural hearing loss and proteinuria	S/S
<b>Sialic acid storage disease: ISSD<sup>b</sup>, Salla disease<sup>b</sup> and intermediate severity Salla disease<sup>b</sup> (<i>SLC17A5</i>)</b>	Congenital (ISSD) and infantile to late infantile (Salla)	Sialin (Sialic acids)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Congenital: hydrops fetalis, developmental delay, hypotonia, failure to thrive, coarse facies, seizures, hepatosplenomegaly and cardiomegaly</li> <li>• Infantile to late infantile: hypotonia, intellectual disability, seizures, ataxia, spasticity and athetosis</li> </ul>	S/S
<b>Niemann–Pick disease types C1 and C2<sup>b</sup> (<i>NPC1</i> and <i>NPC2</i>)</b>	Juvenile	NPC intracellular cholesterol transporter 1 and 2 (Cholesterol and sphingolipids)	Ataxia, vertical supranuclear gaze palsy, dystonia, liver disease, splenomegaly, interstitial lung disease, difficulty swallowing, intellectual decline and seizures	SRT
<b>Mucopolipidosis IV<sup>b</sup> (<i>MCOLN1</i>)</b>	Infantile	Mucopolipin 1 (Lipids and mucopolysaccharides)	Psychomotor delay, hypotonia, spasticity, corneal clouding, retinopathy, achlorhydria and iron deficiency anaemia	S/S
<b>Neuronal ceroid lipofuscinoses</b>				
<b>CLN1: Haltia–Santavuori disease and INCL<sup>b</sup> (<i>PPT1</i>)</b>	Infantile, juvenile or adult	Palmitoyl-protein thioesterase 1 (Lipidated thioesters and saposins A and D)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infantile: developmental regression by 18 months, hypotonia, deceleration of head growth and cerebral atrophy, myoclonus, epilepsy and vision loss</li> <li>• Juvenile: Intellectual decline in childhood, myoclonus, epilepsy and vision loss</li> <li>• Adult: ataxia and parkinsonism</li> </ul>	S/S
<b>CLN2, also known as Jansky–Bielschowsky disease<sup>b</sup> (<i>TPP1</i>)</b>	Late infantile or juvenile	Tripeptidyl peptidase 1 (Subunit c of mitochondrial ATP synthase)	• Late infantile: intractable epilepsy, cognitive arrest, myoclonus and ataxia	ERT

			<ul style="list-style-type: none"> <li>Juvenile: severe ataxia but milder developmental decline and myoclonus</li> </ul>	
<b>CLN3, also known as Batten–Spielmeier–Sjogren disease<sup>b</sup> (CLN3)</b>	Juvenile	Battenin (Subunit c of mitochondrial ATP synthase)	Progressive visual loss, developmental regression and later hypokinesia including muscle rigidity and slow or diminished movements	S/S
<b>CLN4: Parry disease and Kufs type A and B<sup>b</sup> (DNAJC5)</b>	Adult	Cysteine string protein (Subunit c of mitochondrial ATP synthase)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Kufs type A: marked myoclonus, progressive epilepsy, dementia, ataxia</li> <li>Kufs type B: behavioural changes, dementia, facial dyskinesia</li> </ul>	S/S
<b>CLN5: Finnish variant late infantile<sup>b</sup> (CLN5)</b>	Late infantile, juvenile or adult	Ceroid-lipofuscinosis neuronal protein 5 (lysosomal protein of unknown function) (Subunit c of mitochondrial ATP synthase)	Developmental regression, myoclonic epilepsy, ataxia and vision loss	S/S
<b>CLN6: Lake–Cavanagh or Indian variant<sup>b</sup> (CLN6)</b>	Juvenile or adult (Kufs A)	Transmembrane ER protein (Subunit c of mitochondrial ATP synthase)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Juvenile: developmental regression, epilepsy, ataxia, myoclonus, dysarthria and vision loss</li> <li>Adult: ataxia, epilepsy, dysarthria and progressive loss of intellectual function without visual loss</li> </ul>	S/S
<b>CLN7: Turkish variant<sup>b</sup> (MFSD8)</b>	Late infantile or juvenile	Major facilitator superfamily domain containing 8 (Subunit c of mitochondrial ATP synthase)	Epilepsy, developmental regression, myoclonus, ataxia, speech impairment and vision loss	S/S
<b>CLN8: northern epilepsy, epilepsy mental retardation<sup>b</sup> (CLN8)</b>	Late infantile or juvenile	Protein CLN8 (Subunit c of mitochondrial ATP synthase)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Late infantile: developmental delay with progressive myoclonus, seizures, retinopathy and regression</li> <li>Juvenile: intractable epilepsy with progressive decline</li> </ul>	S/S
<b>CLN9<sup>b</sup> (N/A)</b>	Juvenile	N/A	Clinically indistinguishable from CLN3 but more-rapid course	S/S
<b>CLN10<sup>b</sup> (CTSD)</b>	Congenital, late infantile, juvenile or adult	Cathepsin D (Saposins A and D)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Congenital: microcephaly, neonatal epilepsy, respiratory insufficiency and rigidity</li> </ul>	S/S

			• Late infantile, juvenile or adult: ataxia, visual loss and cognitive decline	
<b>CLN11<sup>b</sup> (GRN)</b>	Adult	Granulin (Unknown)	Progressive visual loss, seizures, cerebellar ataxia and atrophy	S/S
<b>CLN12<sup>b</sup>: Kufor–Rakeb syndrome or PARK9 (ATP13A2)</b>	Juvenile	Cation-transporting ATPase 13A2 (Inorganic cations)	Mood disturbance, akinesia, rigidity and dysarthria	S/S
<b>CLN13<sup>b</sup> (CTSF)</b>	Adult (Kufs B)	Cathepsin F (Unknown)	Behavioural abnormalities and dementia	S/S
<b>CLN14<sup>b</sup> (KCTD7)</b>	Infantile	Potassium channel tetramerization domain containing 7 (Unknown)	Progressive myoclonic epilepsy, abnormal eye movements and developmental regression	S/S
<b>LRO disorders</b>				
<b>Hermansky–Pudlak disease type 1 (HPS1)</b>	Infantile	BLOC3 subunit 1 (LRO biogenesis)	Oculocutaneous albinism, easy bruising, prolonged bleeding and pulmonary fibrosis	S/S
<b>Hermansky–Pudlak disease type 2 (HPS2)</b>	Infantile	AP-3 complex subunit $\beta$ 1 (Protein sorting)	Oculocutaneous albinism, easy bruising and pulmonary fibrosis	S/S
<b>Hermansky–Pudlak disease type 3 (HPS3)</b>	Infantile	BLOC2 subunit 1 (Protein sorting and/or transport)	Oculocutaneous albinism and easy bruising	S/S
<b>Hermansky–Pudlak disease type 4 (HPS4)</b>	Infantile	BLOC3 subunit 2 (LRO biogenesis)	Oculocutaneous albinism, easy bruising and pulmonary fibrosis	S/S
<b>Hermansky–Pudlak disease type 5 (HPS5)</b>	Infantile	BLOC2 subunit 2 (Retrograde lysosomal trafficking)	Oculocutaneous albinism and easy bruising	S/S
<b>Hermansky–Pudlak disease type 6 (HPS6)</b>	Infantile	BLOC2 subunit 3 (Retrograde lysosomal trafficking)	Oculocutaneous albinism and easy bruising	S/S
<b>Hermansky–Pudlak disease type 7 (HPS7)</b>	Infantile	Dysbindin (LRO biogenesis)	Oculocutaneous albinism and easy bruising	S/S
<b>Hermansky–Pudlak disease type 8 (HPS8)</b>	Infantile	BLOC1 subunit 3 (HPS8)	Oculocutaneous albinism and easy bruising	S/S
<b>Hermansky–Pudlak disease type 9 (HPS9)</b>	Infantile	BLOC1 subunit 6 (Vesicular trafficking)	Oculocutaneous albinism and easy bruising	S/S
<b>Griscelli syndrome 1, also known as Elejalde syndrome (MYO5A)</b>	Infantile	Unconventional myosin Va, also known as motor myosin (LRO transport)	Hypopigmentation, silvery-grey hair, developmental delay, seizures, hypotonia and visual impairment	S/S

<b>Griscelli syndrome 2 (<i>RAB27A</i>)</b>	Infantile	Ras-related protein Rab-27A (LRO transport)	Hypopigmentation, silvery-grey hair, recurrent infection and haemophagocytic lymphohistiocytosis	S/S
<b>Chédiak–Higashi disease<sup>b</sup> (<i>LYST</i>)</b>	Infantile, juvenile or adult	Lysosomal trafficking regulator (Size and movement of lysosomes)	Recurrent infection, oculocutaneous albinism, easy bruising and abnormal bleeding, progressive neurological problems of tremor, ataxia, peripheral neuropathy and cognitive decline	HSCT

## CHAPITRE IV : La maladie de Fabry

### I. Les sphingolipides

#### 1. Métabolisme

Les sphingolipides sont des lipides complexes dérivés de la sphingosine, présents notamment dans les membranes plasmiques. Ils jouent un rôle dans la reconnaissance des cellules. Ils participent également à la transmission du signal intracellulaire.

Ils ont été découverts dans les années 1870 dans des extraits de cerveau et ont été nommés d'après le sphinx, en raison de leur nature énigmatique<sup>227</sup>. Ils résultent de l'amidification d'un acide gras sur une sphingosine (**Figure 29**).

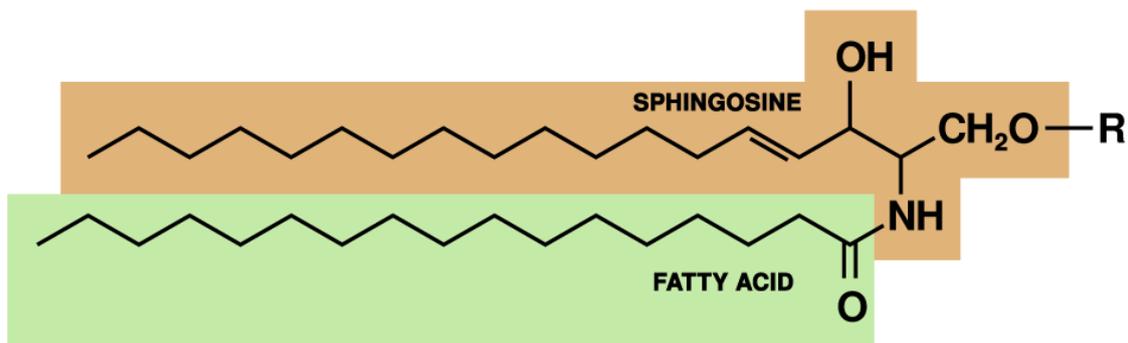


Figure 29. Structure d'un sphingolipide générique

R : tête polaire hydrophyle, fatty acid : acide gras amidifié sur une sphingosine. Figure libre de droits.

Différents groupements (R) peuvent s'ajouter sur la fonction alcool primaire de la sphingosine. En fonction de la nature du groupe R, on distingue notamment les céramides (R est un atome d'hydrogène), les phosphosphingolipides – dont la sphingomyéline (R est une phosphocholine ou phosphoéthanolamine) qui est un des principaux constituants de la gaine de myéline – et les glycosphingolipides (R est un ose). Parmi les glycosphingolipides, on distingue (voir **Figure 30**) :

- les cérébrosides, qui possèdent une molécule unique de glucose ou de galactose en position 1-hydroxy,

- les sulfatides, qui sont des cérebrosides sulfatés,
- les gangliosides, qui ont au moins 3 sucres dont un acide sialique.

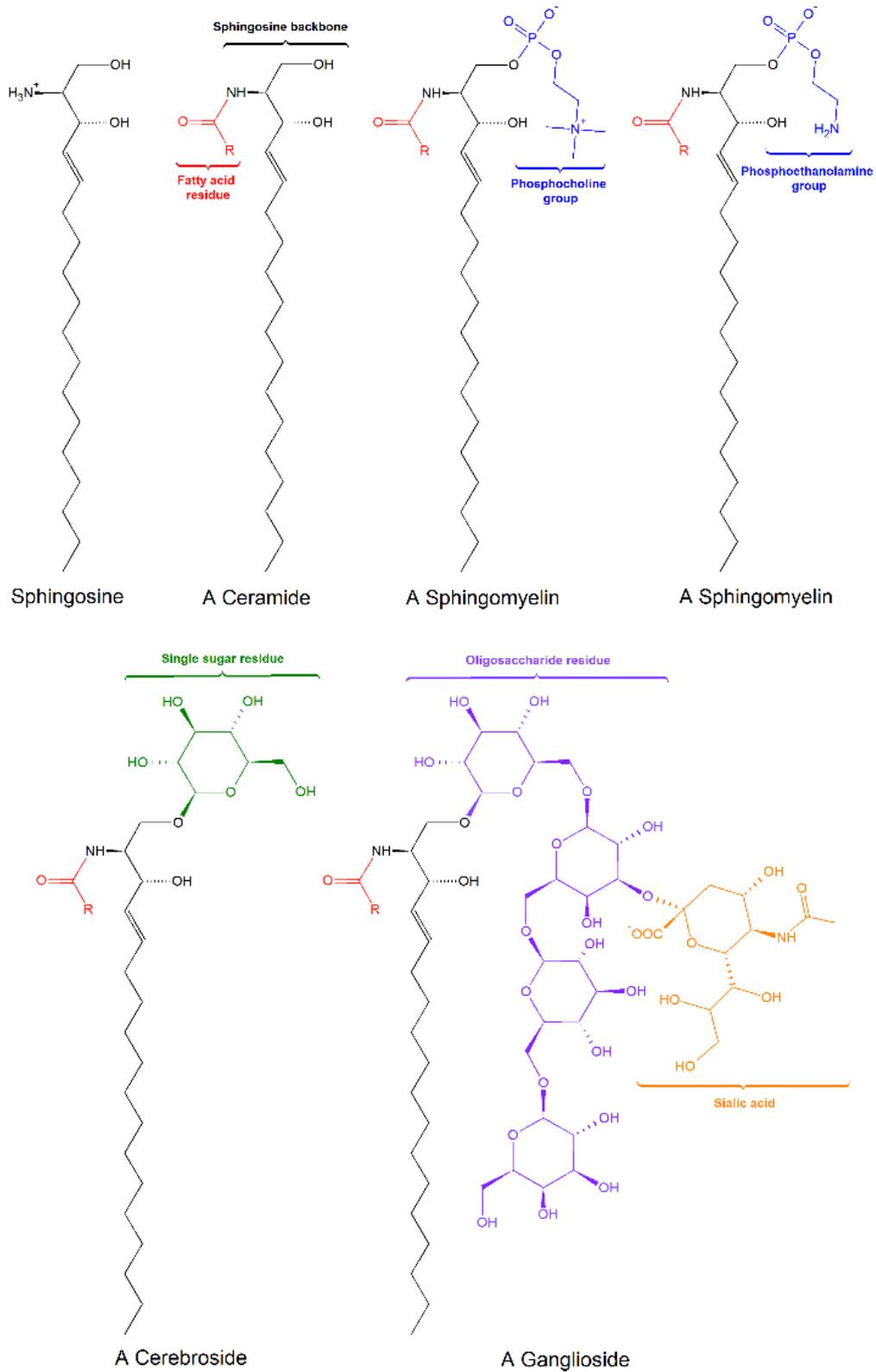


Figure 30. Différents types de glycosphingolipides.  
Figure libre de droits.

## 2. Synthèse des sphingolipides

La synthèse *de novo* des sphingolipides commence par la formation de la 3-céto-dihydrosphingosine (ou céto-sphinganine) par la sérine palmitoyl-CoA transférase<sup>228</sup> (**Figure 31**, enzyme 1). Les substrats privilégiés pour cette réaction sont le palmitoyl-CoA et la sérine. Cependant, la sérine palmitoyl-CoA transférase peut catalyser la réaction entre d'autres espèces d'acyl-CoA gras et des acides aminés alternatifs, avec une diversité plus importante qu'initialement établit<sup>229-231</sup>. La 3-céto-dihydrosphingosine est ensuite réduite pour former la dihydrosphingosine (ou sphinganine). La dihydrosphingosine est acylée par l'une des six céramides synthases, (CerS 1-6, **Figure 31**, enzyme 3) pour former du dihydrocéramide<sup>232</sup>. Les six enzymes CerS ont une spécificité différente pour les substrats acyl-CoA, ce qui entraîne la production de dihydrocéramides avec des longueurs de chaîne différentes, allant de 14 à 26 carbones. Les dihydrocéramides sont ensuite désaturés pour former le céramide<sup>233</sup>.

Le céramide généré *de novo* est le pivot central du métabolisme des sphingolipides et a plusieurs destins. Il peut être phosphorylé par la céramide kinase pour former le céramide-1-phosphate. Il peut également être glycosylé par la glucosylcéramide synthase ou la galactosylcéramide synthase, ou converti en sphingomyéline par l'ajout d'un groupe de tête phosphorylcholine par la sphingomyéline synthase. Ces composés sont ensuite modifiés pour former des globosides et des gangliosides, des sulfatides ou des phosphosphingolipides respectivement<sup>234</sup>.

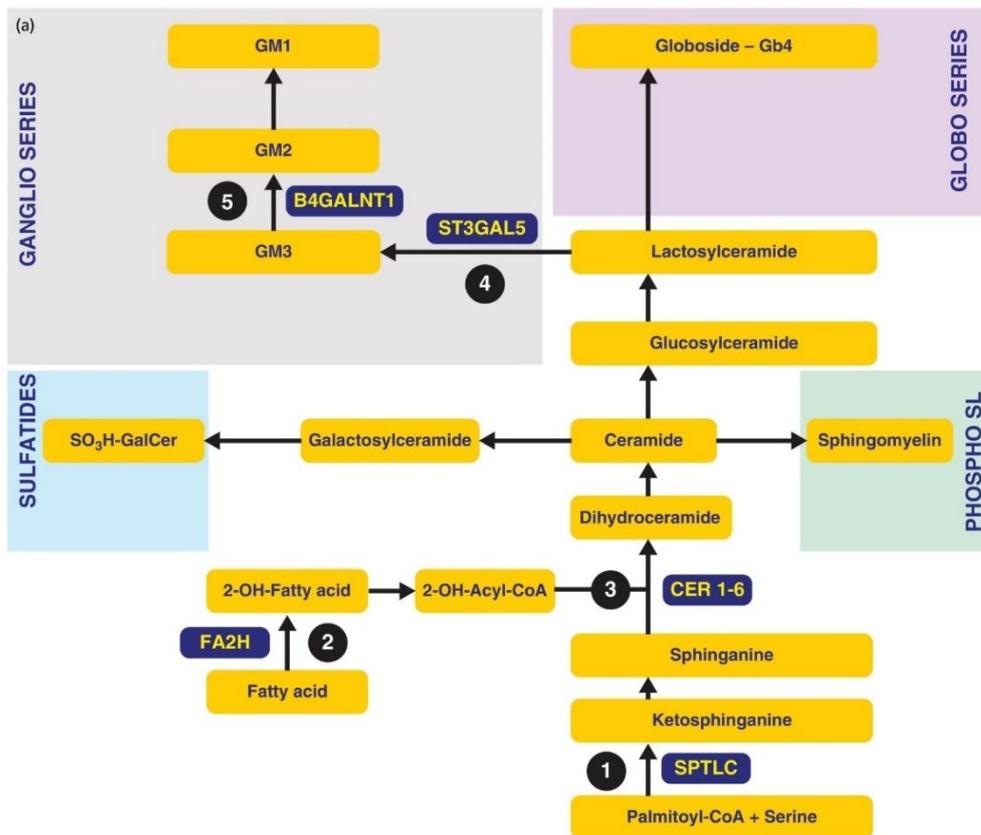


Figure 31. Biosynthèse des sphingolipides et des glycosphingolipides.<sup>235</sup>

Les pathologies liées aux déficits de la voie de synthèse des sphingolipides et de la dégradation non lysosomale ont été reconnues secondairement (Figure 32).

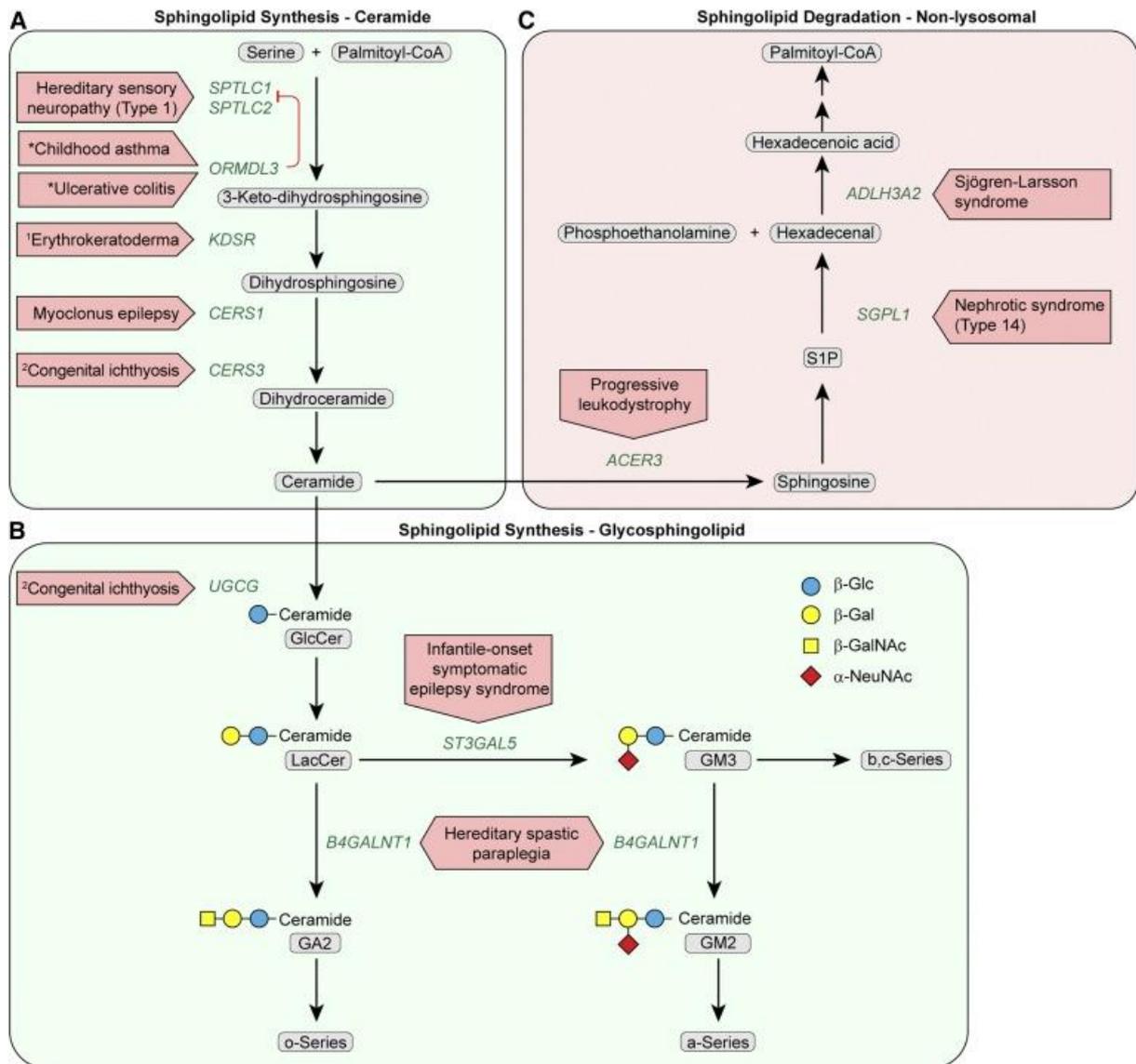


Figure 32. Pathologies résultant de déficits dans la voie de synthèse du céramide et les glycosphingolipides et dans la voie de dégradation non lysosomale des sphingolipides.

Un astérisque identifie une prédisposition à une maladie. <sup>236</sup>

Ces métabolites peuvent être reconvertis en céramides via des voies de dégradation. Les glycosphingolipides complexes sont hydrolysés en glucosylcéramide et galactosylcéramide, eux-mêmes hydrolysés par les beta-glucosidases et les beta-galactosidases pour régénérer le céramide. De même, la sphingomyéline peut être dégradée par la sphingomyélinase pour reformer du céramide. Le céramide peut être ensuite dégradé en sphingosine par une céramidase (**Figure 33**). La sphingosine peut être phosphorylée pour former du sphingosine-1-phosphate. Ce dernier peut être déphosphorylé pour reformer la sphingosine<sup>234</sup>.

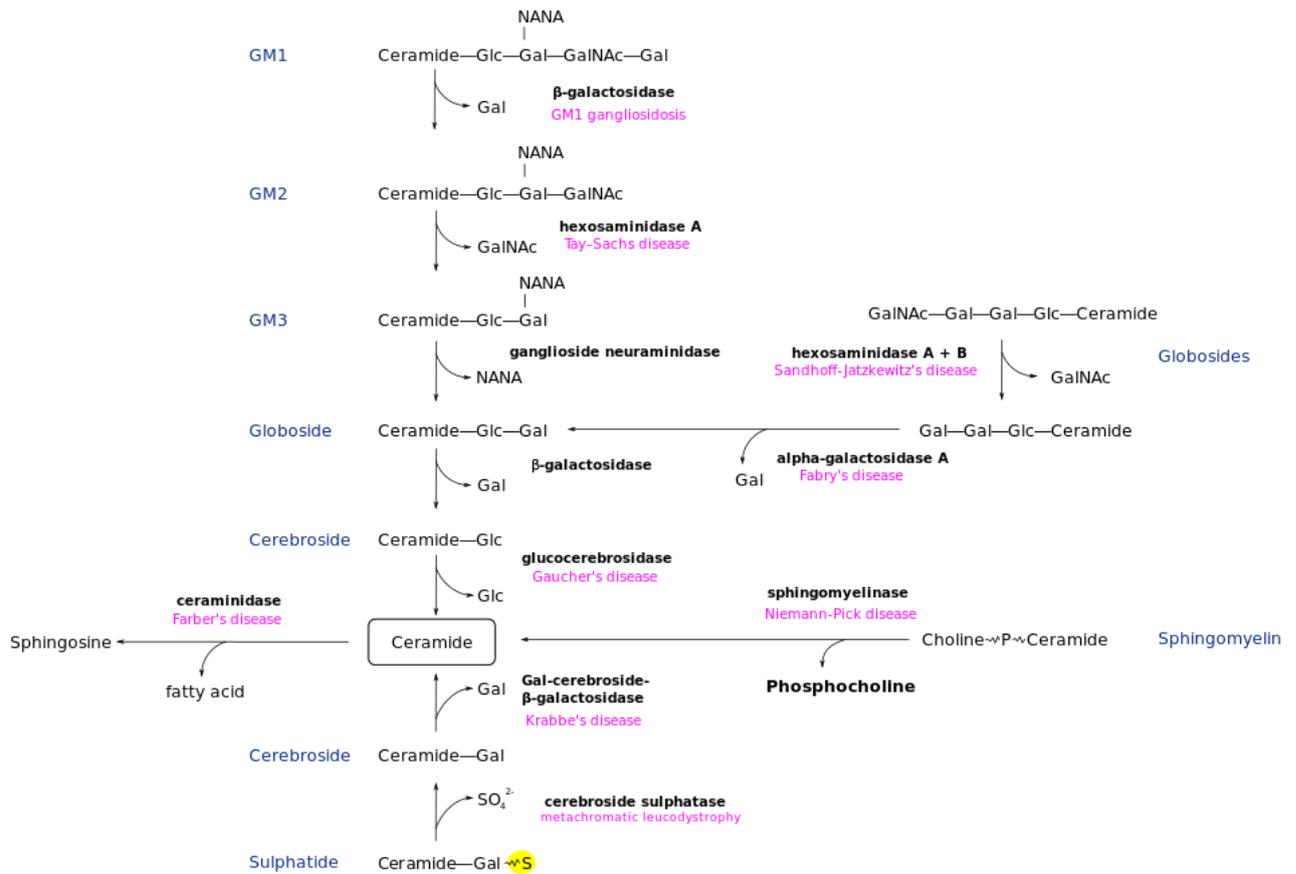


Figure 33. Voies métaboliques des différentes formes de sphingolipides. Les sphingolipidoses sont marquées aux étapes correspondantes qui sont déficientes. Figure libre de droits.

### 3. Rôles

En formant un feuillet externe mécaniquement stable et chimiquement résistant de la bicouche lipidique de la membrane plasmique, les sphingolipides participent à la protection de la surface cellulaire contre les facteurs environnementaux délétères. Certains glycosphingolipides complexes sont impliqués dans des fonctions spécifiques, telles que la reconnaissance cellulaire qui dépend principalement des propriétés physiques des sphingolipides. Ils sont également impliqués dans la signalisation cellulaire par l'interaction spécifique des structures glycanes des glycosphingolipides avec des lipides similaires présents sur les cellules voisines ou avec des protéines<sup>237</sup>.

Le céramide et le sphingosine-1-phosphate sont quant à eux des médiateurs importants dans les cascades de signalisation intracellulaire impliquées dans l'apoptose, la prolifération, la réponse au stress, la nécrose, l'inflammation, l'autophagie, la sénescence et la différenciation cellulaire<sup>237-242</sup>.

Les sphingolipides sont synthétisés dans une voie qui commence dans le RE et s’achève dans l’appareil de Golgi. Ces lipides sont enrichis dans la membrane plasmique et dans les endosomes, où ils remplissent la majorité de leurs fonctions<sup>243</sup>. Le transport se fait par l’intermédiaire de vésicules de transport. Les sphingolipides sont pratiquement absents des mitochondries et du RE, mais constituent de 20 à 35 mol % des lipides de la membrane plasmique<sup>244</sup>.

## II. Les sphingolipidoses

Les maladies lysosomales liées à un déficit du catabolisme des sphingolipides sont appelées sphingolipidoses. Leur incidence est d’environ 1 sur 10 000 en moyenne mais peut être plus élevée dans certaines populations juives Ashkénazes. Leur transmission se fait sur un mode autosomique récessif, à l’exception de la maladie de Fabry qui est liée à l’X.

Les sphingolipidoses sont décrites dans le **Tableau 6** ci-dessous.

Tableau 6. Description des sphingolipidoses<sup>245</sup>.

Disease	Inheritance	Mutant Gene	#OMIM	Deficient Protein, UniProt Accession	Description	Estimated Prevalence in General Population
GM1-gangliosidosis	AR	GLB1	230500 230600 230650	$\beta$ -Galactosidase 1, P16278	Predominant damage to the nervous system, various degrees of neurodegeneration, and skeletal anomalies	1:100,000–200,000
GM2-gangliosidosis, Tay–Sachs disease	AR	HEXA	272800	$\beta$ -Hexosaminidase A, $\alpha$ -subunit P06865		1:100,000
GM2-gangliosidosis, Sandhoff disease	AR	HEXB	268800	$\beta$ -Hexosaminidase A, $\beta$ -subunit P07686	Predominant damage to the nervous system and various degrees of neurodegeneration	1:500,000
AB variant of GM2-gangliosidosis	AR	GM2A	272750	GM2A, P17900		Extremely rare
Fabry disease	XL	GLA	301500	$\alpha$ -Galactosidase A, P06280	Multisystemic disease; progressive renal failure;	1:100,000–500,000

Disease	Inheritance	Mutant Gene	#OMIM	Deficient Protein, UniProt Accession	Description	Estimated Prevalence in General Population
					skin, cardiovascular, and nervous system lesions	
Gaucher disease	AR	GBA1	230800 230900 231000 231005 608013	$\beta$ -Glucocerebrosidase 1, P04062	Multisystemic disease, predominant damage to cells of mononuclear phagocyte origin (Gaucher cells); varying degree of damage to the nervous system; high risk of developing Parkinson's disease	1:40,000–60,000
SapC deficiency, atypical Gaucher disease	AR	PSAP	610539	Saposin C, P07602		Extremely rare
Metachromatic leukodystrophy	AR	ARSA	250100	Arylsulfatase A, P15289		1:40,000–160,000
SapB deficiency, atypical metachromatic leukodystrophy	AR	PSAP	249900	Saposin B, P07602	Damage to the white matter or myelin sheath in nervous system cells	Extremely rare
Krabbe disease	AR	GALC	245200	Galactocerebrosidase, P54803		1:100,000
SapA deficiency, atypical Krabbe disease	AR	PSAP	611722	Saposin A, P07602	Damage to the white matter or myelin sheath in nervous system cells	Extremely rare
Type A and B Niemann–Pick disease	AR	SMPD1	257200 607616	Sphingomyelinase, Q9NY59	Damage to the nervous system, bone marrow, spleen, and, in some cases, lungs	1:250,000
Farber disease	AR	ASAH1	228000	Acid ceramidase, Q13510	Multisystem disease with progressive joint deformation and dysfunctions of multiple organ systems, including the nervous system	<1:1,000,000
Combined saposin deficiency	AR	PSAP	611721	Saposins A, B, C, and D, P07602	Fatal disorder affecting the nervous system	Extremely rare

### III. La maladie de Fabry

#### 1. Histoire

Les premières descriptions de la maladie de Fabry ont été faites en 1898 par deux médecins. Travaillant indépendamment l'un de l'autre, William Anderson et Johannes Fabry (**Figure 34**), médecins anglais et allemand, ont décrit des patients atteints d'« *angiokeratoma corporis diffusum* », des lésions cutanées maculopapuleuses rouge-violettes qui sont maintenant reconnues comme un trait caractéristique de la maladie<sup>246-248</sup>. William Anderson décrit les symptômes dermatologiques d'un patient de 39 ans associé à une protéinurie, une déformation des doigts, des varices veineuses et un lymphœdème. Johannes Fabry quant à lui décrit un patient de 13 ans qui avait développé quatre ans auparavant des éruptions cutanées dans le creux de son genou gauche qui se sont propagées à la cuisse et le tronc gauches. A l'époque, il avait été suggéré que la maladie pourrait représenter une forme de *naevus* ou de défaut de développement. L'enfant développa plus tard une albuminurie.

Si la maladie est connue sous le nom de maladie de Fabry, elle est parfois appelée maladie d'Anderson-Fabry.

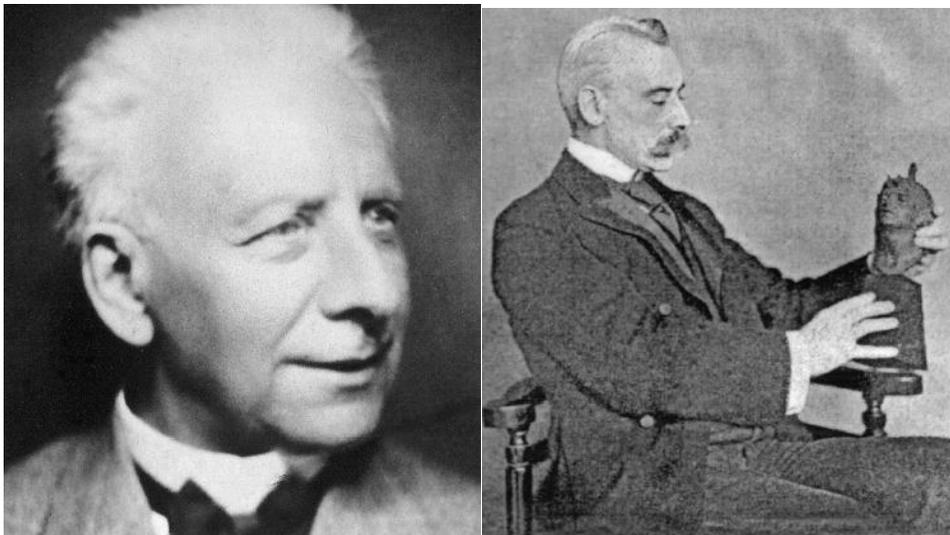


Figure 34. Johannes Fabry (à gauche) et William Anderson (à droite).

Après ces premières observations d'angiokéramatome *corporis diffusum*, d'autres symptômes associés ont été décrits avant que le lysosome ne soit identifié comme l'organite clé impliqué dans la pathogénie de la maladie de Fabry et d'autres maladies héréditaires du métabolisme<sup>249</sup> (**Figure 35**).

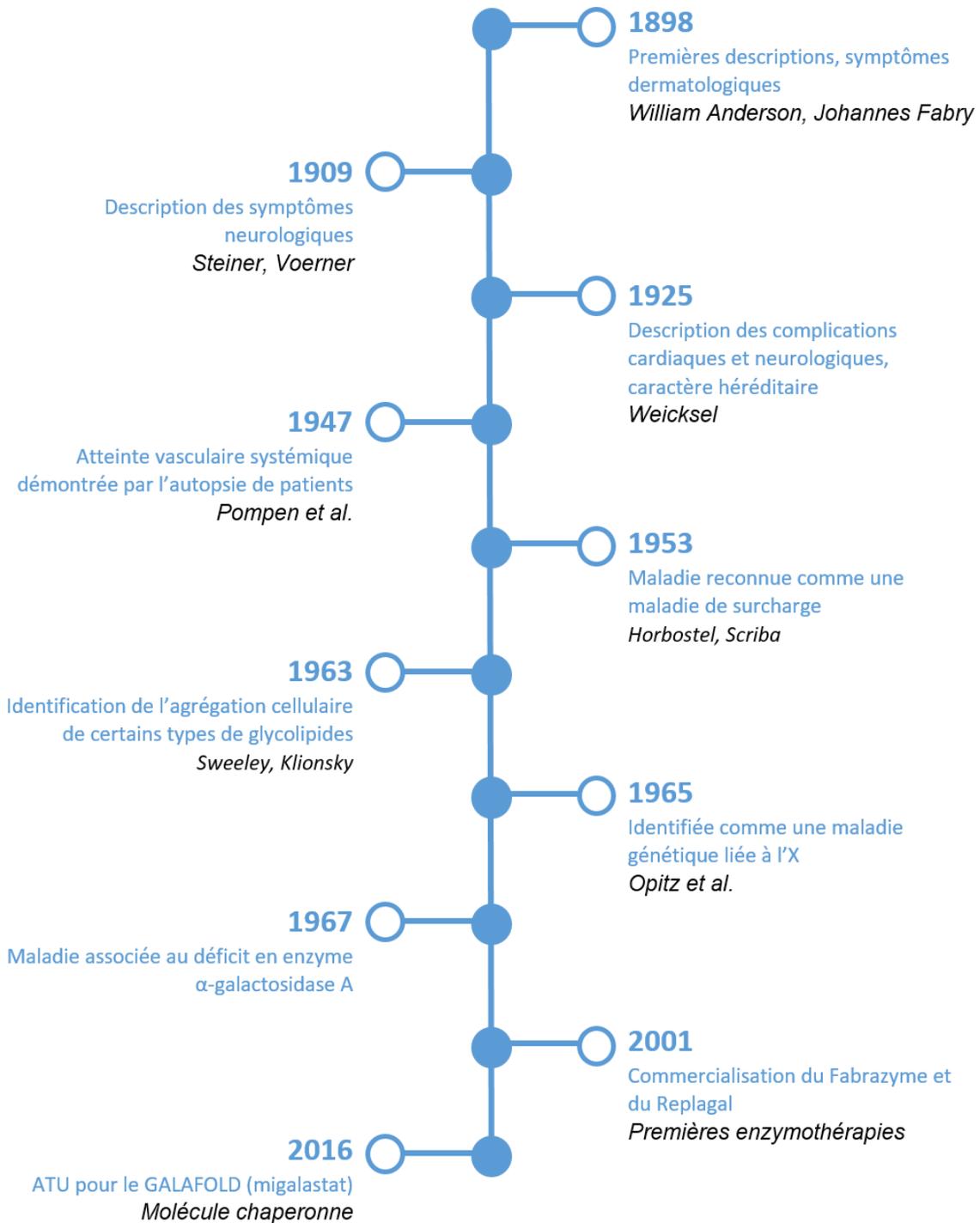


Figure 35. Histoire de la maladie de Fabry. D'après <sup>246</sup>

## 2. Définition

La maladie de Fabry (FD, #OMIM 301500) est une sphingolipidose multisystémique, de transmission liée à l’X, due à un déficit de l’enzyme alpha-galactosidase A ( $\alpha$ -GAL) (voir **Figure 33**). Elle est caractérisée par des manifestations cutanées (angiokératomes), neurologiques (douleurs), rénales (protéinurie, insuffisance rénale chronique), cardiovasculaires (cardiomyopathie, arythmie), cochléo-vestibulaires et cérébrovasculaires (accidents ischémiques transitoires, accidents vasculaires cérébraux). L’expression phénotypique est variable et dépend de l’âge auquel la maladie se déclare et, chez la femme, de la répartition de l’inactivation du chromosome X dans les tissus. Elle est due à des variants pathogènes dans le gène *GLA* qui code pour l’ $\alpha$ -galactosidase A.

## 3. Epidémiologie

La maladie de Fabry est une maladie rare panéthnique dont les incidences rapportées varient en fonction de la méthode de recueil et de la région étudiée. Les premières incidences rapportées allant de 1/40 000<sup>250</sup> à 1/117 000<sup>196</sup> garçons nés vivants semblent sous-estimer de manière importante l’incidence effective de la maladie, comme mis en évidence par les récents programmes de dépistage néonatal (1/4 000 garçons nés vivants en Italie du Nord)(**Tableau 7**). Ces chiffres sont cependant à moduler puisqu’ils représentent le nombre de garçons porteurs d’un variant dans le gène *GLA*, de nombreux variants n’étant pas encore associés à la pathologie et étant classés comme de signification indéterminée.

Tableau 7. Études de prévalence de la maladie de Fabry.  
D’après<sup>251</sup>

Méthodes	Période de constatation	Nombre total de cas	Nbre par 100000	Pays
Prévalence des naissances	1980-1996	36	0,85	Australie
Prévalence des naissances	1970-1996	27	0,21	Pays-Bas
Prévalence des femmes conductrices	1980-1995	60	0,29	Royaume-Uni
Prévalence (hommes uniquement)	1980-1995	98	0,27	Royaume-Uni
Prévalence des naissances	1997-2002	1	0,015	Turquie
Prévalence des naissances	1982-2001	1	0,12	Nord du Portugal
Dépistage néonatal	2004-2006	12	30	Italie
Dépistage néonatal	2006-2008	73	80	Taiwan

## IV. Mode de transmission

### 1. Maladie liée à l'X

La maladie de Fabry est héritée sur un mode lié à l'X. Les mères hétérozygotes ont 50% de chances de transmettre l'allèle atteint à leur enfant à chaque conception. Les fils qui héritent de l'allèle pathogène auront la maladie de Fabry ; les filles, autrefois considérées comme des porteuses asymptomatiques, ou femmes conductrices, peuvent développer des manifestations de la maladie allant de légères à graves<sup>252</sup>. Ainsi, le terme de transmission « récessive » liée à l'X ne doit plus être employé dans le cadre de cette pathologie. Bien qu'une histoire familiale positive soit un argument fort de maladie de Fabry, des variants *de novo* ont été documentés, l'absence d'antécédents familiaux n'exclut donc pas un Fabry.

### 2. Inactivation de l'X

L'inactivation du chromosome X (*X chromosome inactivation*, XCI) aussi appelé lyonisation est un mécanisme épigénétique qui égalise le dosage des gènes liés à l'X entre les sexes par l'inactivation d'un chromosome X chez les femelles. À la fin du processus, les femelles sont une mosaïque de deux types cellulaires exprimant soit le chromosome X maternel, soit le chromosome X paternel. Une XCI aléatoire se traduit par environ 50 % des cellules présentant l'inactivation du chromosome X maternel ou paternel, tandis qu'un biais d'inactivation (*skewed XCI*) indique une inactivation du chromosome X maternel ou paternel supérieure à 50 %, généralement avec un rapport de 75:25 ou 80:20 entre les deux chromosomes. Le biais peut être extrême lorsqu'un chromosome X est inactivé dans plus de 90 % des cellules<sup>253</sup> (**Figure 36**).

Le biais d'inactivation de l'X pourrait dépendre de plusieurs facteurs, tels que des mécanismes génétiques, comme des mutations du gène *XIST* (*X-inactive specific transcript*), impliqué dans des cas de biais d'inactivation de l'X familiaux<sup>254,255</sup>. Un autre facteur est la plasticité : les cellules des tissus à fort taux de renouvellement, telles que les cellules hématopoïétiques, présentent une XCI asymétrique plus élevée que les cellules à activité mitotique plus faible<sup>256,257</sup>.

L'inactivation de l'X est mise en place au cours du développement embryonnaire. Si l'inactivation de l'X est aléatoire lors de sa mise en place dans une cellule donnée, les cellules filles, elles, inactiveront le même chromosome. Ainsi, en fonction de la période du développement à laquelle la XCI se met en

place et du devenir des cellules, un biais d'inactivation peut concerner certains types cellulaires ou certains tissus. Chez les femmes Fabry, ce phénomène peut expliquer en partie les atteints d'organes isolés.

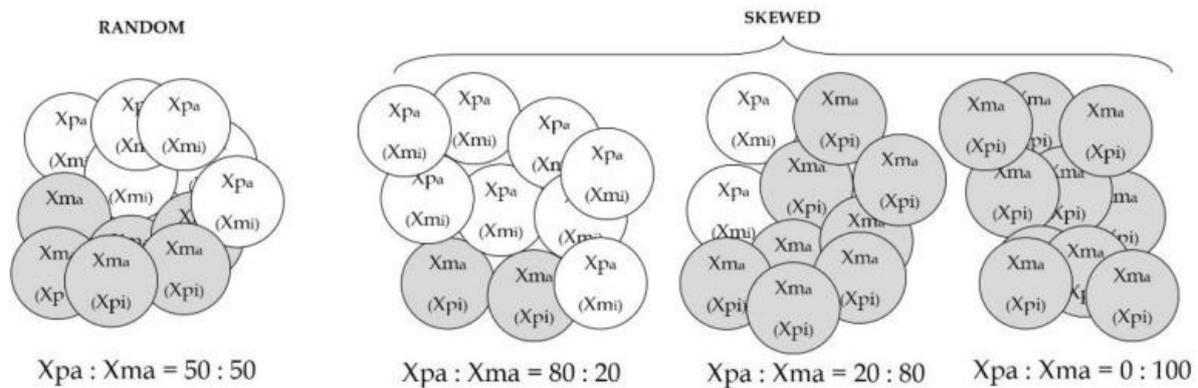


Figure 36. Inactivation de l'X chez les femmes en bonne santé. Chaque tissu des femmes est une mosaïque de cellules, comprenant des cellules (cercle blanc) dans lesquelles le chromosome X paternel est activé (Xpa) et le chromosome X maternel est inactivé (Xmi) et des cellules (cercle gris) dans lesquelles le chromosome X maternel est activé (Xma) et le chromosome X paternel est inactivé (Xpi).<sup>258</sup>

## V. L'alpha galactosidase A

### 1. Le gène

Le gène codant l'α-galactosidase A (*GLA*, OMIM 300644, RefSeq X14448) est localisé sur le bras long du chromosome X (Xq22.1) et est composé de 7 exons s'étendant sur 12 kb<sup>259</sup>. Le gène code pour un précurseur de 429 acides aminés qui est processé en une glycoprotéine de 370 acides aminés. L'enzyme fonctionne sous la forme d'un homodimère.

Il existe une grande hétérogénéité allélique. A ce jour, plus d'un millier de variants ont été rapportés dans la base de données Human Gene Mutation Database, dont 69% de variants faux-sens ou non-sens, 14% de petites délétions, 5% de variants d'épissage, 5% de petites insertions ou duplications et 5% de grands réarrangements (*copy number variants*, CNV)

(<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=GLA>, accédé le 17/07/2023).

Un grand nombre de variants sont des variants de signification indéterminée (VSI ou VUS, *variants of unknown significance*). Ceci, combiné à la non-spécificité de certains symptômes de la maladie de Fabry, fait de l'interprétation des variants *GLA* un véritable défi. Traditionnellement, l'interprétation

des variants est basée sur les recommandations de l'*American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) qui propose une approche combinée utilisant notamment les fréquences alléliques, les bases de données en population générale et cliniques ainsi que des outils *in silico*<sup>260</sup>. Or, la réanalyse de certains variants controversés en prenant en compte les phénotypes des patients, la prévalence, l'hérédité, les biomarqueurs, les fréquences alléliques, les bases de données spécifiques et la littérature a permis de les classer comme probablement bénins (par exemple p.(Ala143Thr), p.(Asp313Tyr))<sup>261</sup> (**Figure 37**).

De nombreuses familles présentent des variants privés expliquant potentiellement la variabilité marquée de l'activité enzymatique résiduelle, mais n'expliquant qu'en partie l'histoire naturelle de la maladie puisqu'une variabilité intra-familiale existe. Il existe des variants récurrents comme à Taïwan où 86 % des patients sont porteurs du variant c.640-801G>A (IVS4+919G>A), un variant d'épissage cryptique précédemment retrouvée chez des patients avec un phénotype cardiaque d'apparition tardive<sup>262</sup>.

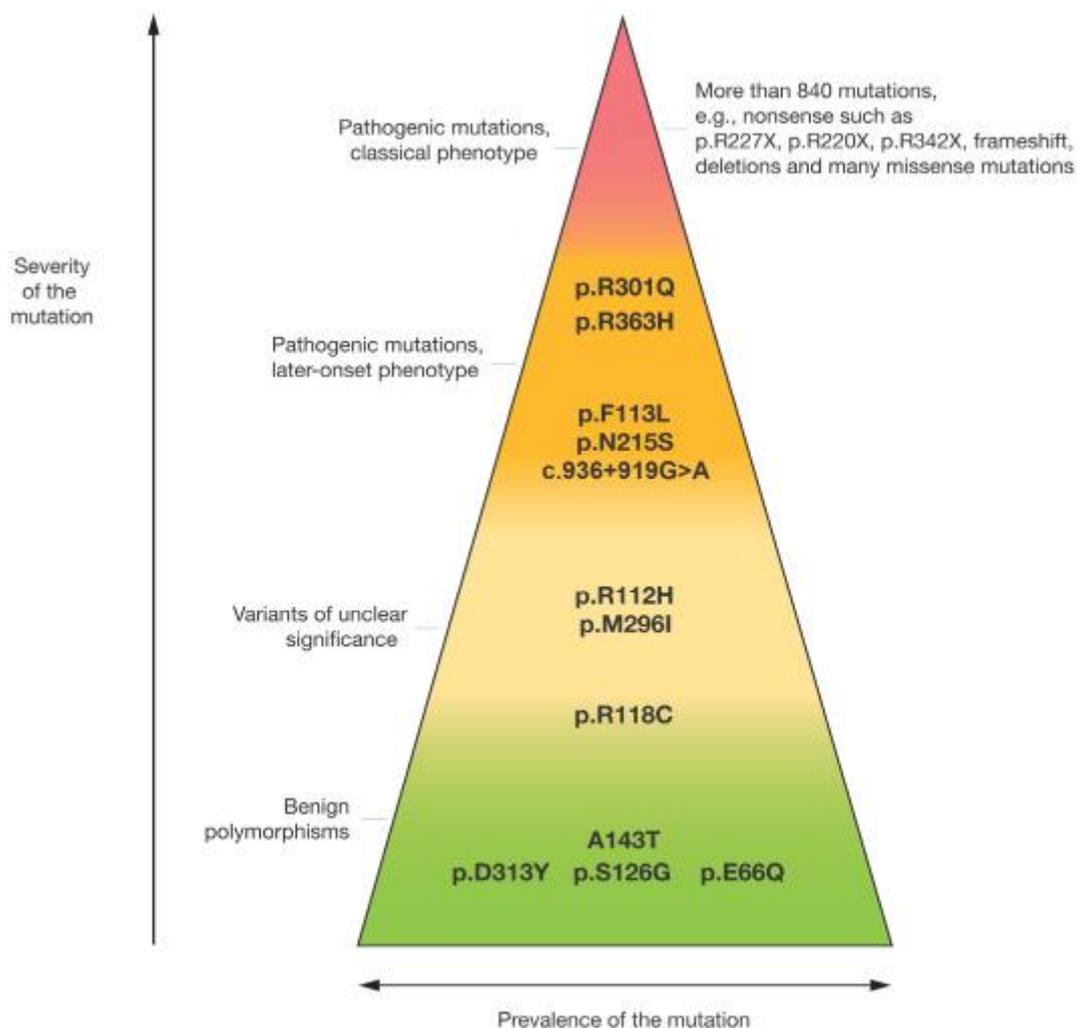


Figure 37. Quelques variants clés associés au phénotype classique ou tardif de la maladie de Fabry, des variants GLA de signification indéterminée (VSI ou VUS) et des variants bénins.<sup>263</sup>

## 2. L'enzyme

L' $\alpha$ -galactosidase A ( $\alpha$ -GAL) est une enzyme lysosomale qui appartient à la famille des glycosides hydrolases. Elle est responsable de l'hydrolyse des groupes terminaux alpha-galactosyle des glycolipides et des glycoprotéines. Son substrat principal est le globotriaosylcéramide (Gb3 ou GL3) (**Figure 38**).

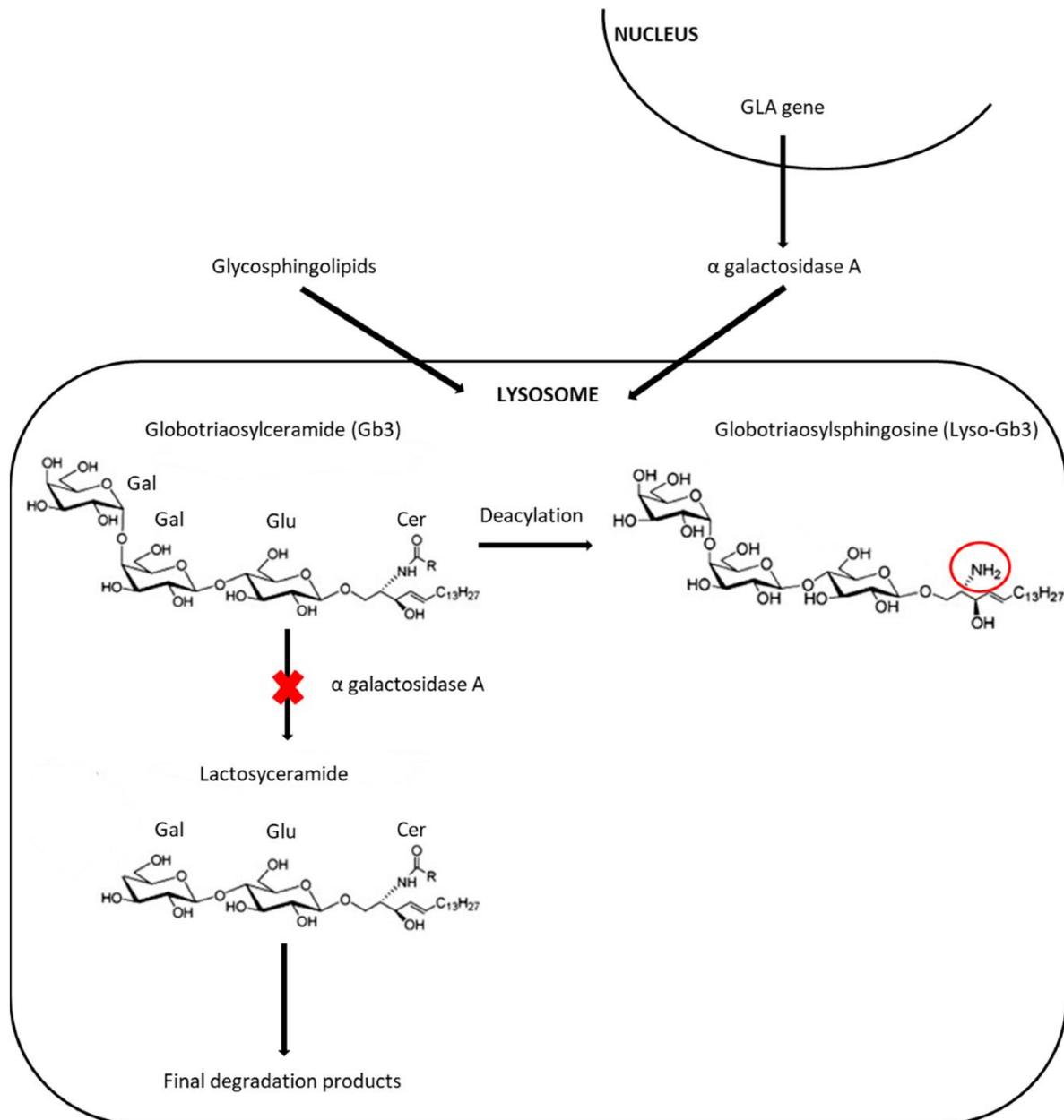
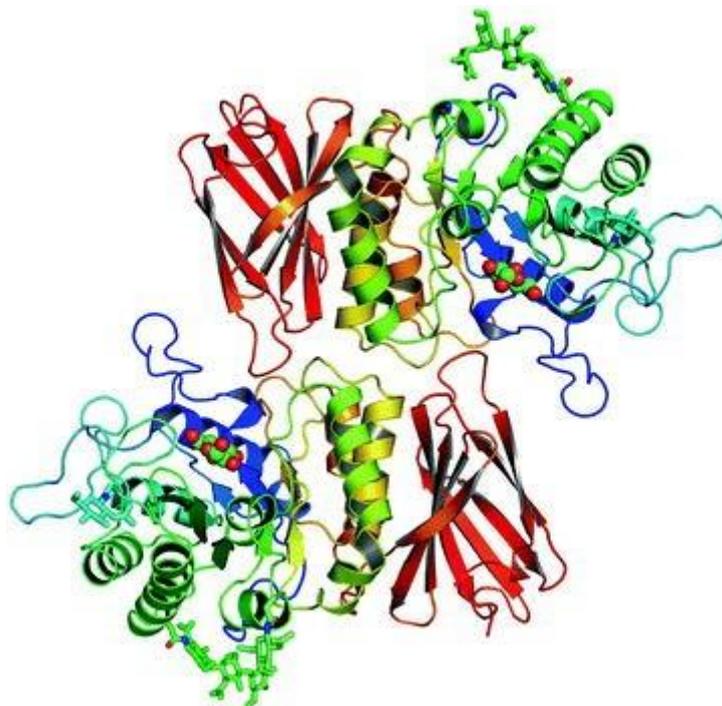


Figure 38. Voie métabolique impliquée dans la maladie de Fabry<sup>264</sup>

Le précurseur de l'enzyme est synthétisé dans le réticulum endoplasmique rugueux et subit des modifications post-traductionnelles dans l'appareil de Golgi, où l' $\alpha$ -GAL nouvellement synthétisée est modifiée par l'ajout de résidus mannose-6-phosphate (M6P) sur ses chaînes N-oligosaccharidiques. Ces résidus M6P servent de signaux de reconnaissance pour les récepteurs du mannose-6-phosphate (M6PR) qui transportent l'enzyme vers les endolysosomes dans des vésicules recouvertes de clathrine. Ce transport peut être effectué de l'appareil de Golgi vers les endosomes puis les lysosomes ou à partir de la membrane plasmique, permettant de recapturer l'enzyme sécrétée. Une fois dans les endosomes, le complexe  $\alpha$ -GAL-M6PR se dissocie dans le milieu acide, et les récepteurs se recyclent vers leurs compartiments d'origine (membrane plasmique et/ou TGN)<sup>246</sup> (voir Chap II : II.4).

La structure tridimensionnelle de l' $\alpha$ -galactosidase A humaine a été déterminée par cristallographie aux rayons X. La structure cristalline a montré une molécule homodimérique avec chaque monomère contenant deux domaines (**Figure 39**). Le domaine N-terminal contient le site actif, qui est situé à l'extrémité C-terminale. Les chaînes oligosaccharidiques se fixent aux résidus asparagine N139, N192 et N215 à la surface de la molécule, à distance de l'emplacement du site actif et loin de l'interface du dimère<sup>265</sup>. Le site actif est formé de résidus de chaîne latérale de W47, D92, D93, Y134, C142, K168, D170, C172, E203, L206, Y207, R227, D231, D266 et M267. Les résidus C142 et C172 forment une liaison disulfure. Les deux sites actifs dans le dimère sont séparés d'environ 50 Å.



*Figure 39. Vue d'ensemble du dimère de l' $\alpha$ -galactosidase A. La trace du polypeptide  $\alpha$ -galactosidase A est représentée par un arc-en-ciel allant du bleu à l'extrémité N-terminale au rouge à l'extrémité C-terminale. Les glucides N-liés sont représentés sous forme de liaisons et le ligand galactose est représenté sous forme de sphères, marquant le site actif dans le premier domaine<sup>265</sup>.*

L'enzyme utilise un mécanisme de réaction à double déplacement, où deux attaques nucléophiles consécutives sur le carbone anomérique du substrat conduisent à la rupture de la liaison glycosidique avec une rétention globale de l'anomère du produit (**Figure 40**). Dans l' $\alpha$ -galactosidase A humaine, le nucléophile catalytique est le résidu D170 et l'acide/base catalytique est le D231<sup>266</sup>.

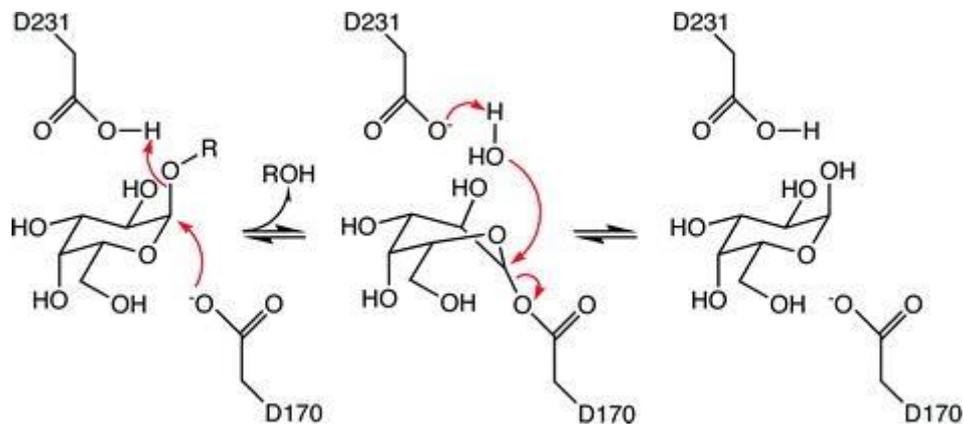


Figure 40. Le mécanisme catalytique de l' $\alpha$ -galactosidase A. Tout d'abord, D170 effectue une attaque nucléophile sur C1 du substrat, rompant la liaison glycosidique et générant un intermédiaire covalent. Deuxièmement, une molécule d'eau (déprotonée par D231) effectue une attaque nucléophile sur le même carbone, rompant la liaison covalente entre l'enzyme et le ligand et générant le produit de la réaction, l' $\alpha$ -galactose. Lorsque le produit diffuse à partir du site actif, l'enzyme est prête pour un autre cycle de catalyse.<sup>265</sup>

## VI. Physiopathologie

Le déficit fonctionnel de l' $\alpha$ -GAL conduit à une accumulation progressive de Gb3 dans toutes les cellules du corps contenant des lysosomes, notamment l'endothélium vasculaire et les cellules musculaires lisses, les cardiomyocytes du ventricule et de l'oreillette gauches, les fibroblastes valvulaires<sup>267</sup>. L'accumulation du Gb3 est progressive et les nouveau-nés ne présentent pas de symptômes. Il n'y a pas de corrélation entre la sévérité des symptômes cliniques et le taux de Gb3 dans le plasma ou les urines et une variabilité phénotypique intra-familiale malgré la même anomalie génétique<sup>268-271</sup>.

L'hypertrophie cardiaque est une des manifestations caractéristiques de la maladie de Fabry. Cependant, la contribution du matériel stocké à l'augmentation de la masse cardiaque est limitée à 1

à 2 %<sup>272</sup>. Des niveaux accrus de Gb3 tissulaires seraient donc à l'origine d'autres mécanismes pathogéniques.

Une augmentation du taux de la forme déacylée du Gb3, le globotriaosylsphingosine (lyso-Gb3, voir **Figure 38**) est également observée dans le plasma des patients Fabry, y compris chez les femmes hétérozygotes<sup>273</sup>. Le lyso-Gb3 est impliqué dans la vasculopathie, car il induit la prolifération des cellules musculaires lisses qui est associée à l'hypertrophie et aux parois artérielles myocardiques et à la fibrose, *in vitro*<sup>273,274</sup>.

Le stockage de Gb3 induit une production excessive d'espèces réactives de l'oxygène, augmentant ainsi le stress oxydatif<sup>275</sup>. En particulier, l'augmentation de la production d'oxygène radicalaire et la diminution des antioxydants, tels que le glutathion et le superoxyde, provoquent une altération des myofilaments, altérant la contractilité et la distensibilité, et favorisant l'apoptose au niveau cardiaque<sup>276,277</sup>.

Le Gb3 régule également à la hausse l'expression des molécules d'adhérence dans l'endothélium vasculaire<sup>278</sup>. D'autres données indiquent que le Gb3 peut provoquer la libération de cytokines pro-inflammatoires, en particulier dans les cellules dendritiques et les monocytes, puisque les médiateurs inflammatoires (tels que TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) sont augmentés dans le plasma des patients atteints<sup>279,280</sup>. De plus, le Gb3 activerait la réponse immunitaire innée, en fixant le récepteur TLR4 des cellules immunitaires, ce qui augmente la libération de médiateurs inflammatoires par les cellules mononucléaires du sang périphérique<sup>280</sup>. Le rôle de l'inflammation est également étayé par la biopsie endomyocardique qui montre une augmentation des macrophages inflammatoires dans les tissus<sup>281,282</sup>. La réponse inflammatoire peut également être déclenchée par l'altération vasculaire. Le remodelage vasculaire pourrait réduire la compliance artérielle, déterminant la régulation positive du système rénine-angiotensine et l'augmentation de l'angiotensine 1 et 2 dans les cellules endothéliales, qui déclenchent l'inflammation<sup>283-285</sup>. La conséquence de l'inflammation est la libération de facteurs pro-thrombotiques dans les vaisseaux, augmentant le risque d'ischémie en augmentant le dépôt de matrice extracellulaire et la fibrose<sup>283,286</sup>.

Ces données suggèrent que le stockage du Gb3 peut agir en déclenchant une cascade de processus physiopathologiques conduisant à des altérations de la structure cellulaire, à des lésions tissulaires et, avec le temps, à une défaillance des organes.

Indépendamment de l'accumulation de substrats, plusieurs grands processus sont impactés : l'inflammation, le stress oxydant, l'autophagie...<sup>287,288</sup>. Toutes les bases mécanistiques de la pathologie ne sont pas élucidées et sont actuellement explorées grâce aux sciences omiques.

## VII. Présentations cliniques

### 1. Signes et symptômes dans la maladie de Fabry

La maladie de Fabry est une maladie multisystémique avec un large éventail de symptômes et une variabilité phénotypique importante.

Les atteintes principales sont les atteintes du système nerveux central et périphérique, les lésions cérébrovasculaires, les atteintes cutanées, oculaires, auditives, cardiaques et rénales. Elles sont détaillées ci-dessous. Chez les hommes hémizygotés, deux phénotypes sont décrits, bien que faisant partie d'un continuum clinique : la forme classique, qui récapitule l'ensemble des atteintes de la maladie de Fabry avec une expression clinique débutant dans l'enfance, et la forme non-classique, avec un début plus tardif et une atteinte d'un nombre limité d'organes (atteinte cardiaque, cérébrovasculaire, rénale). Chez les femmes hétérozygotes, le spectre phénotypique englobe les formes asymptomatiques à une extrémité du spectre, ainsi que les formes classiques à l'autre extrémité, du fait de l'inactivation aléatoire de l'X.

Le caractère multisystémique des symptômes de la maladie de Fabry est récapitulé dans la **Figure 41** ci-dessous.

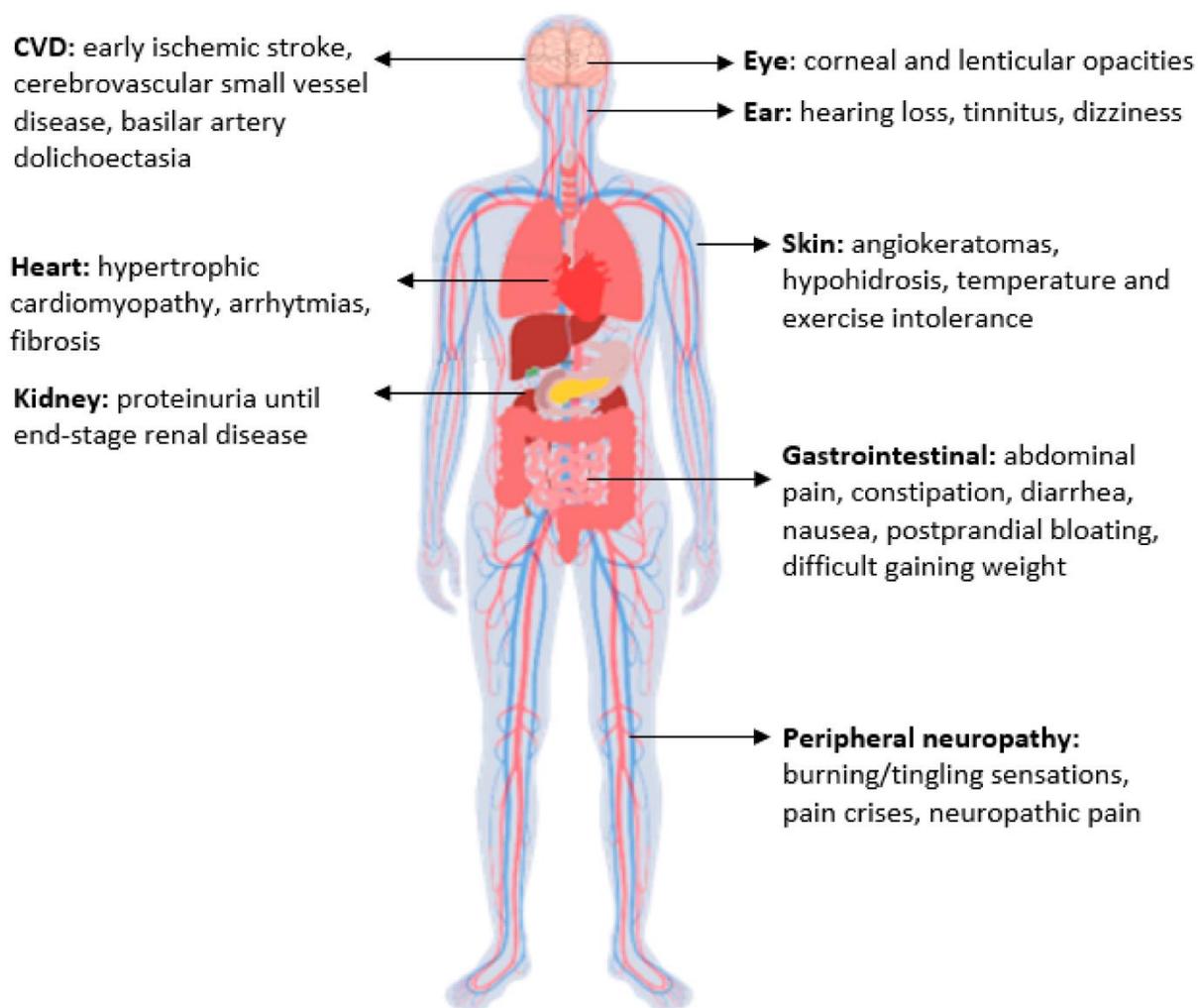


Figure 41. Symptômes de la maladie de Fabry.<sup>264</sup>

#### a) Atteintes précoces du SNC et périphérique

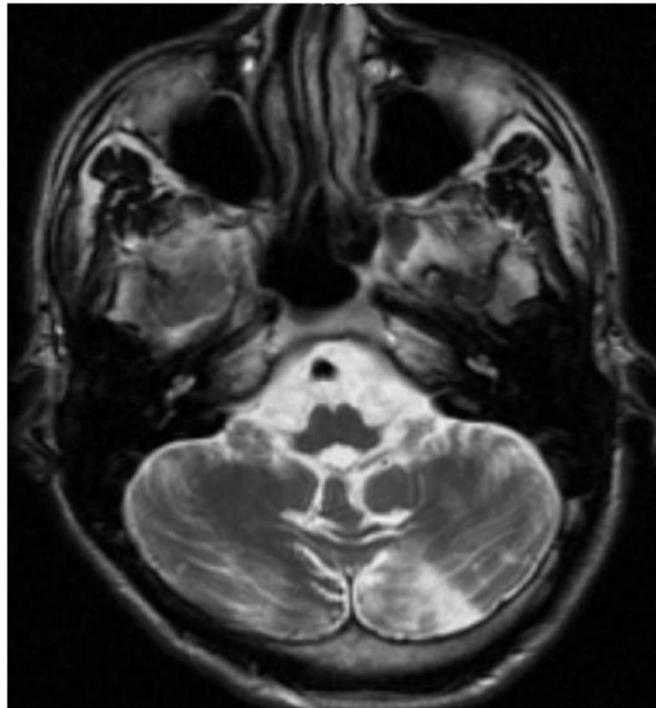
Les lésions neurales précoces concernent principalement les petites fibres nerveuses des systèmes nerveux périphérique somatique et autonome<sup>289,290</sup>. La douleur est ressentie par 60 à 80 % des garçons et des filles atteintes de manière classique et est l'un des premiers symptômes de la maladie de Fabry<sup>291,292</sup>. Deux types de douleur ont été décrits : des crises épisodiques (« crises de Fabry ») caractérisées par des douleurs à type de brûlures irradiantes débutant aux extrémités, et des douleurs chroniques caractérisées par des paresthésies brûlantes et picotements<sup>293</sup>. Les crises de Fabry peuvent être déclenchées par la fièvre, l'exercice, la fatigue, le stress et les changements rapides de température<sup>294</sup>. Lorsque les crises sont déclenchées ou accompagnées de fièvre, les patients présentent généralement une vitesse de sédimentation érythrocytaire élevée. En raison de leur douleur, les patients atteints de maladie de Fabry ont une qualité de vie considérablement altérée<sup>295,296</sup>. La douleur peut s'estomper à l'âge adulte et il est important de rechercher des

antécédents médicaux d'acroparesthésie dans l'enfance lors du premier examen d'un patient adulte nouvellement diagnostiqué<sup>297</sup>.

#### *b) Lésions cérébrovasculaires*

Les premiers signes d'atteintes cérébrovasculaires peuvent être présents pendant l'adolescence chez les deux sexes. Bien que rares, les signes d'atteinte cérébrale ischémique microvasculaire à l'IRM peuvent être détectables à un jeune âge<sup>298</sup>.

Les lésions cérébrovasculaires sont le résultat d'une atteinte multifocale des petits vaisseaux sanguins<sup>299,300</sup>. L'atteinte cérébrovasculaire peut entraîner une grande variété de signes et de symptômes, allant de légers à graves, y compris des maux de tête, des vertiges/étourdissements, des accidents ischémiques transitoires, des accidents vasculaires cérébraux (**Figure 42**) et plus rarement une démence vasculaire<sup>300-304</sup>.



*Figure 42. AVC chez un patient atteint de la maladie de Fabry. Coupe axiale d'IRM cérébrale montrant un AVC de l'hémisphère cérébelleux gauche ayant révélé la maladie de Fabry chez un homme de 27 ans par ailleurs asymptomatique. <sup>251</sup>*

En utilisant les données du Fabry Registry®, la prévalence des accidents vasculaires cérébraux a été estimée à 6,9 % chez les hommes et à 4,3 % chez les femmes, bien plus élevée que dans la population

générale. L'âge médian au premier AVC était de 39 ans chez les hommes et de 46 ans chez les femmes et l'AVC peut être la première manifestation de la maladie<sup>300</sup>. Les données du Fabry Registry® et du Fabry Outcome Survey® (FOS®) ont montré que la majorité des accidents vasculaires cérébraux dans la maladie de Fabry sont dus à de petits événements vasculaires<sup>299,300</sup>. Une artériopathie dilatatrice de la circulation vertébrobasilaire a également été documentée<sup>301,305</sup>. La formation de thrombus peut être favorisée en raison de l'adhésion des neutrophiles et des monocytes aux parois des cellules endothéliales ou de modifications de l'hyperperfusion cérébrale régionale<sup>306-308</sup>. Les lésions de la substance blanche peuvent être uniques, multiples ou confluentes en IRM<sup>309</sup>. De plus, une implication neuronale diffuse, s'étendant au-delà des zones d'anomalies cérébrovasculaires visibles à l'IRM, a été retrouvée<sup>310</sup>. L'IRM cérébrale peut révéler des lésions périventriculaires de la substance blanche, des microhémorragies, des infarctus corticaux de la substance grise et des infarctus lacunaires profonds de la substance grise et de la substance blanche<sup>300,311-313</sup>.

#### *c) Atteinte gastro-intestinale*

L'atteinte gastro-intestinale est une manifestation courante, mais sous-estimée<sup>314</sup>. Les patients peuvent se plaindre de douleurs abdominales (souvent après avoir mangé), de diarrhée, de nausées et de vomissements, qui sont une cause importante d'anorexie<sup>315</sup>. Ces symptômes gastro-intestinaux peuvent être liés au dépôt de Gb3 dans les ganglions autonomes de l'intestin et des vaisseaux sanguins mésentériques<sup>316</sup>.

#### *d) Anomalies de la transpiration*

L'absence de transpiration (anhidrose) ou une diminution de la capacité à transpirer (hypohidrose) avec une diminution de l'impédance cutanée est un problème important pour les patients et peut provoquer une intolérance à la chaleur et à l'exercice<sup>316-321</sup>. Plusieurs cas d'hyperhidrose ont également été rapportés<sup>322</sup>.

#### *e) Atteintes cutanées*

La caractéristique clinique précoce la plus visible de la maladie de Fabry est l'angiokératome. Des grappes de petites lésions cutanées en relief violet rougeâtre (**Figure 43**) se retrouvent généralement sur les fesses, l'aîne, le nombril et le haut des cuisses, mais aussi parfois sur des zones muqueuses,

telles que la bouche. Histologiquement, les lésions cutanées sont de petits angiomes superficiels causés par des lésions des cellules endothéliales vasculaires de la peau avec une dilatation des vaisseaux dans le derme qui augmentent en nombre et en taille avec l'âge<sup>318,321,323</sup>. Des télangiectasies et des œdèmes sous-cutanés ont également été rapportés<sup>318,320,324</sup>.



Figure 43. Angiokératomes

Les angiokératomes sont de petites taches rouges foncées surélevées qui augmentent en nombre et en taille avec l'âge et peuvent apparaître isolément ou en grappes. Ils se trouvent généralement sur le bas du dos (A), les fesses (C), l'aîne, les flancs (D) et le haut des cuisses, mais leur distribution peut être limitée à une zone limitée, comme l'ombilic (B).<sup>251</sup>

#### f) Atteintes oculaires

Les opacités cornéennes visibles à la lampe à fente (cornée verticillée) sont les signes oculaires les plus fréquents et les plus précoces, survenant chez presque tous les hommes hémizygotés<sup>325</sup> (**Figure 44**). Une tortuosité légère à marquée des vaisseaux conjonctivaux et rétiniens est également observée chez les patients<sup>251,325</sup>.

Ni la dystrophie cornéenne ni les lésions rétiniennes/conjonctivales n'altèrent l'acuité visuelle ; cependant, une perte visuelle aiguë causée par une occlusion unilatérale de l'artère centrale de la rétine a été rapportée<sup>326</sup>. Des cataractes sous-capsulaires antérieure et postérieure sont également observées, cette dernière étant également appelée « cataracte de Fabry » en ce qu'elle représente un

signe oculaire pathognomonique. Un élargissement de la tache aveugle a été rapporté chez 38,7 % (n = 27) des patients, bien que cela n'ait été associé à aucun défaut de la vision des couleurs<sup>325</sup>.

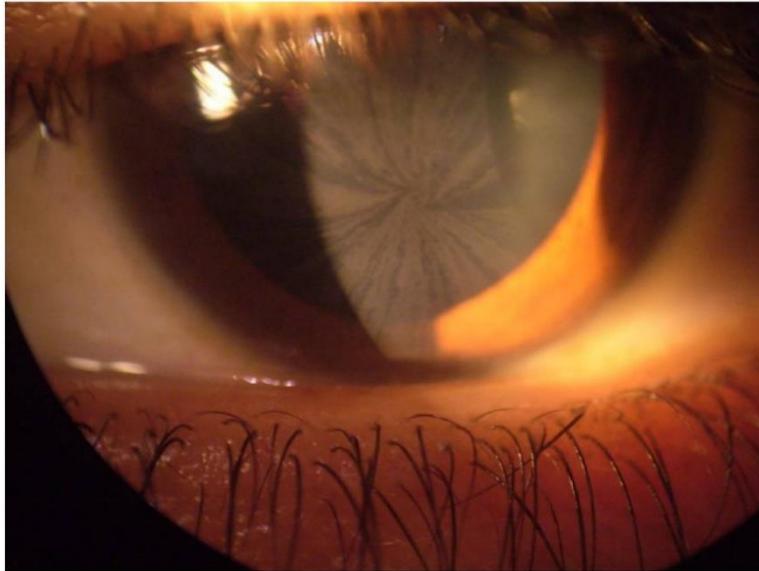


Figure 44. Cornée d'une patiente hétérozygote. Les lignes brunes sous-épithéliales montrent le schéma typique de ce qu'on appelle la " cornée verticillée ". Ces opacités n'altèrent pas l'acuité visuelle. Courtoisie : Dr Juan-Manuel POLITEI, Buenos-Aires, Argentine<sup>251</sup>.

#### *g) Atteintes auditives*

Les anomalies auditives et vestibulaires sont des déficits fréquents, entraînant des symptômes tels qu'une perte auditive, des acouphènes et des vertiges<sup>327-329</sup>.

Les acouphènes peuvent être un symptôme précoce et une perte auditive a été signalée chez les enfants<sup>330</sup>. Chez les adultes, les patients décrivent une perte auditive progressive ou soudaine avec en majorité des surdités de perception, ainsi que des vertiges.

La perte auditive est due à l'accumulation de glycosphingolipides dans la strie vasculaire et les cellules ganglionnaires. Il pourrait également y avoir une composante endothéliale ou vasculaire à la surdité chez les patients FD, en raison de l'hypertrophie de la paroi capillaire. Le Gb3 s'accumule de manière systémique mais certaines cellules sont des cibles privilégiées, telles que les cellules endothéliales vasculaires et les cellules musculaires lisses entraînant un rétrécissement progressif de la lumière des vaisseaux, une ischémie voire une occlusion franche de la vascularisation de la cochlée<sup>327</sup>. Une corrélation entre les lésions neuropathiques et vasculaires et la perte auditive a été trouvée chez les

hommes, chez qui l'activité résiduelle de l' $\alpha$ -galactosidase A semble avoir un effet protecteur contre la perte auditive<sup>331</sup>.

#### *h) Atteintes cardiaques*

Les premiers signes d'atteintes cardiaques peuvent être présents pendant l'adolescence chez les deux sexes. Des signes d'atteinte du nœud sinusal et du système de conduction (par exemple, intervalle PR raccourci, arythmies, variabilité de la fréquence cardiaque altérée et insuffisance valvulaire légère) ont été montrés<sup>332</sup>.

Des symptômes cardiaques, notamment une hypertrophie ventriculaire gauche, une arythmie, une angine de poitrine et une dyspnée, sont signalés chez environ 40 à 60 % des patients atteints de maladie de Fabry<sup>333-337</sup>. Les arythmies et une variabilité de la fréquence cardiaque altérée résultent de l'implication du nœud sinusal, du système de conduction et du déséquilibre entre le tonus sympathique et parasympathique. La dysfonction diastolique et l'hypertrophie ventriculaire gauche concentrique, qui est généralement non obstructive, sont des caractéristiques importantes, les hommes étant généralement plus gravement touchés que les femmes. L'ischémie et l'infarctus du myocarde peuvent résulter d'une fonction compromise du lit vasculaire coronaire<sup>338</sup>. Avec l'âge, une fibrose myocardique progressive se développe avec à la fois une fibrose interstitielle et une fibrose de remplacement<sup>339,340</sup>. La fibrose de remplacement débute presque toujours dans la paroi postéro-latérale et au milieu du myocarde. La fibrose transmurale de remplacement réduit progressivement la fonction cardiaque au stade de l'insuffisance cardiaque congestive<sup>341-343</sup>. Les arythmies malignes sont responsables de décès<sup>337,343,344</sup>.

Les atteintes cardiaques peuvent être mises en évidence par échographie ou IRM cardiaque (**Figure 45**). L'IRM cardiaque est l'examen non-invasif de choix dans la maladie de Fabry car elle permet d'évaluer de manière exhaustive l'anatomie cardiaque, la fonction ventriculaire globale et localisée et de caractériser les tissus<sup>345</sup>. Le rehaussement tardif au gadolinium permet de détecter et de quantifier la fibrose myocardique, un élément pronostique majeur<sup>346</sup>. La cartographie T1 (*T1 mapping*) calcule le temps de relaxation du myocarde grâce aux intensités du signal. Elle permet quant à elle de caractériser le tissu myocardique en identifiant l'œdème myocardique, l'accumulation de lipides intramyocytaires et l'expansion du volume extracellulaire (protéines ou dépôts de fer)<sup>347</sup>. La surcharge en glycosphingolipides cardiaques dans les stades précoces de la maladie de Fabry induit une diminution des valeurs du *T1 mapping*, qui peut précéder le développement de l'hypertrophie ventriculaire

gauche et de la dysfonction myocardique, faisant du *T1 mapping* un véritable marqueur diagnostique et pronostique<sup>348</sup>.

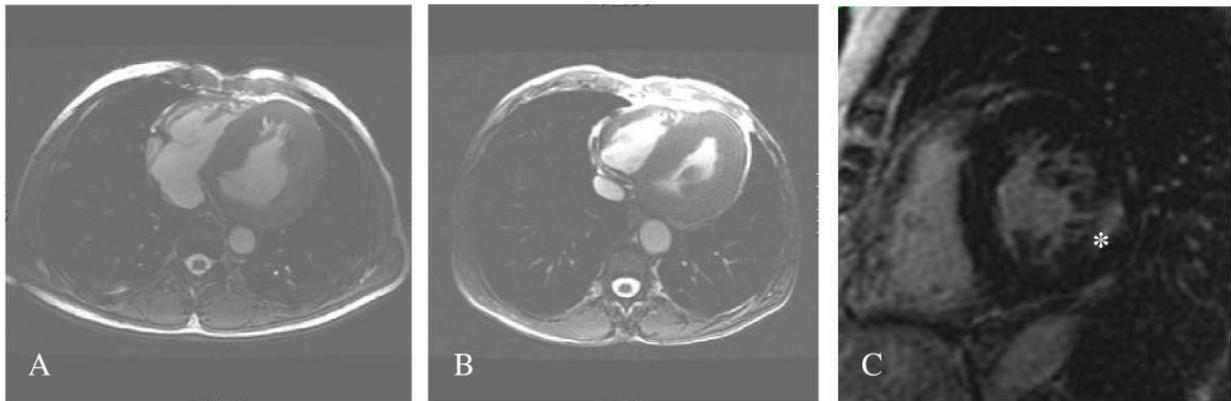


Figure 45. IRM cardiaque pour le bilan de l'hypertrophie et de la fibrose ventriculaire gauche.

A : Hypertrophie ventriculaire gauche chez un homme de 51 ans avec atteinte cérébrovasculaire et insuffisance rénale terminale (dialyse). B : Cardiomyopathie hypertrophique chez un homme de 56 ans avec arythmie, leucoaréose et transplantation rénale. C : Rehaussement tardif après gadolinium chez une patiente de 63 ans en insuffisance rénale terminale (dialyse).<sup>251</sup>

#### i) Atteintes rénales

L'atteinte rénale chez les patients Fabry est connue depuis les rapports originaux d'Anderson et Fabry à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle. L'évolution est progressive et insidieuse avec une microalbuminurie et la protéinurie pouvant se développer dès la deuxième décennie de vie<sup>349-351</sup>. Elle est susceptible d'être plus sévère chez les patients dont l'activité enzymatique résiduelle est inférieure à 1 % que chez ceux dont les taux d'enzymes sont détectables et chez qui l'atteinte rénale commence plus tard. Des modifications histologiques potentiellement irréversibles des glomérules, des tubules interstitiels et des structures vasculaires avant la première apparition de la microalbuminurie peuvent être observées sur biopsie rénale chez les enfants<sup>351</sup>. Un effacement du processus du pied des podocytes a été rapporté et indique une glomérulosclérose segmentaire focale. Une baisse du débit de filtration glomérulaire (DFG) est rare à l'âge pédiatrique, mais peut être observée dès l'adolescence<sup>321,352</sup>. Vingt-cinq pour cent des patients peuvent évoluer vers une insuffisance rénale chronique<sup>353</sup>.

Comme la plupart des aspects de la maladie, la pathologie rénale s'aggrave avec l'âge. Chez les patients atteints d'une forme classique de Fabry, les lésions rénales résultent du dépôt de Gb3 dans les cellules endothéliales glomérulaires, mésangiales, interstitielles et dans les podocytes. Ces derniers sont des cellules épithéliales différenciées en phase terminale qui accumulent de nombreuses inclusions de type myéline dans leurs lysosomes (**Figure 46**).

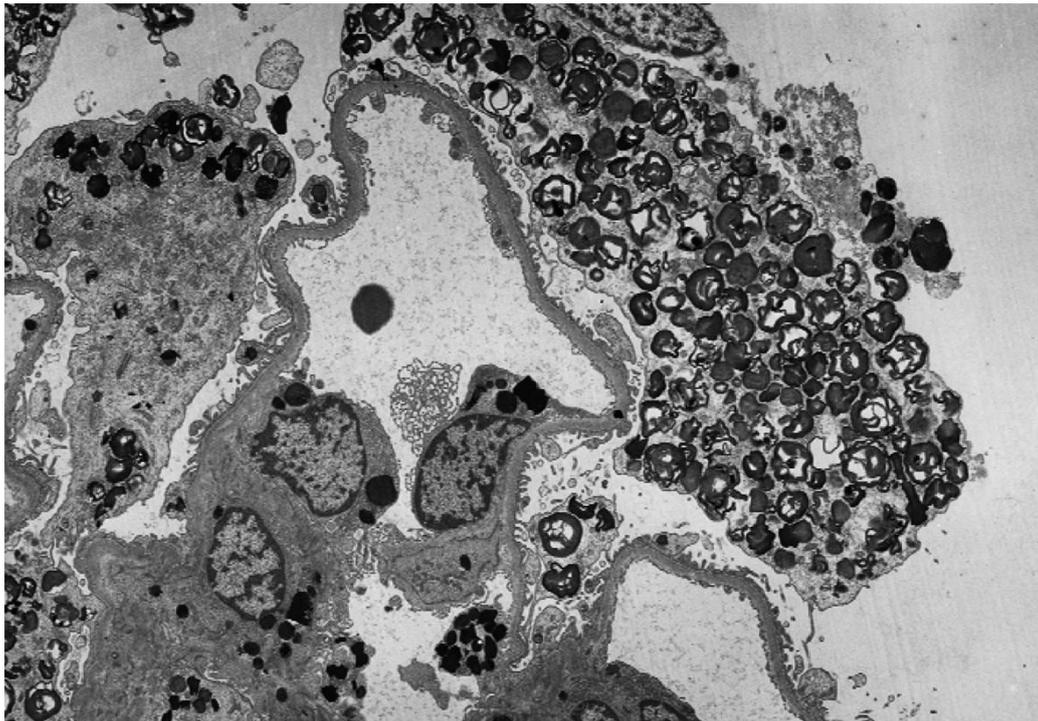


Figure 46. Biopsie rénale.

La microscopie électronique montre un stockage massif de glycosphingolipides dans les lysosomes des podocytes. Courtoisie: Pr Marie-Claire GUBLER, Paris, France.<sup>251</sup>

L'accumulation des glycosphingolipides se produit également dans l'épithélium de l'anse de Henle et des tubules contournés distaux, ainsi que dans les cellules musculaires endothéliales et lisses des artérioles rénales<sup>349,354</sup>.

Avec l'âge, la protéinurie s'aggrave<sup>355</sup>. Initialement, la compensation glomérulaire (hyperfiltration) peut masquer une altération de la fonction rénale mais, une fois qu'un nombre critique de néphrons a été endommagé, la fonction rénale décline progressivement. La détérioration graduelle de la fonction rénale survient généralement entre la troisième et la cinquième décennie de vie<sup>356</sup>. À ce stade, la fibrose, la sclérose et l'atrophie tubulaire dominent l'activité de la maladie, laissant présager une insuffisance rénale terminale qui survient généralement chez les hommes entre la 4<sup>ème</sup> et la 5<sup>ème</sup> décennie de vie<sup>333,357</sup>. Les aspects néphrologiques sont des contributeurs majeurs à la morbidité et à la mortalité associées à la maladie. La progression vers l'insuffisance rénale terminale est la principale cause de décès chez les patients de sexe masculin atteints de maladie de Fabry non traitée et le décès résulte le plus souvent d'une urémie, à moins qu'une hémodialyse chronique ou une transplantation rénale ne soit entreprise<sup>333</sup>.

Les biopsies rénales peuvent être utiles comme évaluation de base et chez les patients présentant des présentations atypiques, y compris une biopsie rénale répétée lorsque la maladie progresse malgré le traitement<sup>354</sup>. Cependant, la biopsie rénale est loin d'être systématique chez les patients avec un diagnostic bien établi et une bonne réponse au traitement.

#### *j) Autres atteintes*

La fatigue chronique et la difficulté à prendre du poids peuvent également survenir fréquemment, en particulier pendant l'adolescence<sup>251</sup>.

Une dysmorphie faciale est rapportée chez quelques patients masculins de Fabry, caractérisée par une plénitude péri-orbitaire, des crêtes supra-orbitaires proéminentes, une grande largeur bitemporale, un ptosis, une base nasale large, une pointe nasale bulbeuse, des lèvres charnues et des traits grossiers<sup>358,359</sup>.

Le priapisme à haut débit peut également être observé chez les jeunes garçons atteints de maladies de Fabry<sup>251</sup>.

L'identification de dépôts de Gb3 au niveau de l'appareil reproducteur a suggéré une altération de la fonction gonadique mâle dans la maladie de Fabry. Papaxanthos-Roche *et al.* ont récemment montré que les patients atteints de FD pourraient avoir un effet néfaste sur les caractéristiques du sperme, mais la fonction reproductrice n'est que légèrement diminuée<sup>360</sup>.

Une atteinte respiratoire peut se manifester par une dyspnée à l'effort, une toux chronique et une respiration sifflante<sup>361</sup>. Vingt-six pourcent des femmes Fabry et 61% des hommes présentent une obstruction des voies respiratoires<sup>362</sup>.

Une ostéopénie voire une ostéoporose précoce sont fréquemment retrouvées chez les patients avec une forme classique<sup>363</sup>.

Jusqu'à 46 % et 28 % des patients peuvent souffrir de dépression et de dépression clinique sévère, respectivement, dépression souvent sous-diagnostiquée<sup>296</sup>. Des évaluations psychiatriques et neuropsychologiques sont donc recommandées.

Les données du FOS® et du Fabry Registry® montrent que les cytopénies sanguines périphériques légères, en particulier l'anémie, sont fréquentes<sup>364</sup>.

Une augmentation significative de l'épaisseur intima-media des artères a été décrite, et ce en l'absence de plaques d'athérosclérose<sup>365</sup>. L'épaississement de l'intima-media et l'hypertrophie ventriculaire gauche se produisent simultanément suggérant une pathogenèse commune<sup>366</sup>.

## 2. Forme classique chez l'homme

La forme classique débute habituellement pendant l'enfance, et les patients peuvent présenter tous les symptômes neurologiques, cutanés, rénaux, cardiovasculaires, cochléo-vestibulaires et cérébrovasculaires caractéristiques de la maladie décrits ci-dessus (**Figure 47**).

Malgré l'absence de dysfonctionnement d'un organe majeur dans l'enfance, ces symptômes, individuellement ou en combinaison, peuvent entraîner une morbidité importante limitant les performances physiques, scolaires et sociales de l'enfant<sup>367</sup>. En l'absence de traitement, ces atteintes d'organes précoces peuvent mettre en jeu le pronostic vital avec un risque de décès lié à l'insuffisance cardiaque et/ou rénale dans la quatrième ou la cinquième décennie de la vie<sup>2</sup>.

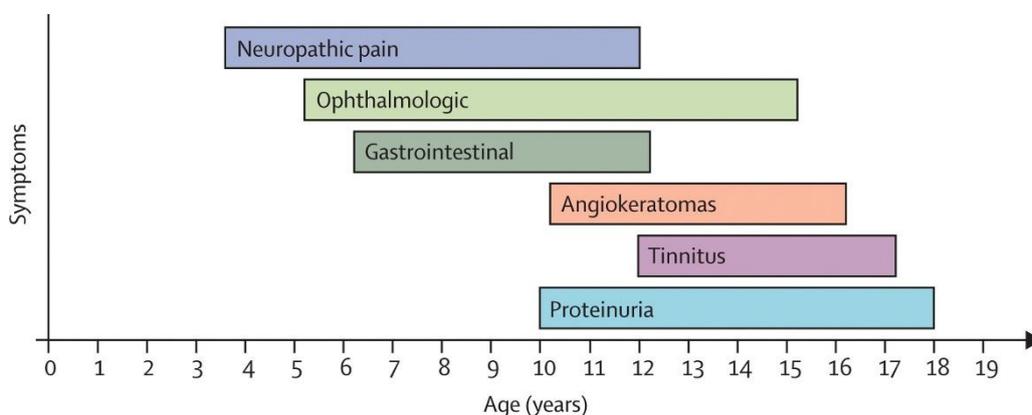


Figure 47. Âge moyen d'apparition des premiers symptômes de la forme classique de la maladie de Fabry.<sup>368</sup>

## 3. Formes non-classiques chez les hommes

La maladie de Fabry a longtemps été considérée comme une maladie multisystémique à part entière, la plupart des hommes atteints développant un phénotype « classique ». Plus tard, les sous-classifications « forme cardiaque » et « forme rénale » ont été introduites pour les patients présentant respectivement une atteinte cardiaque ou rénale prédominante<sup>369,370</sup>. Dans les populations adultes à haut risque, les efforts de dépistage se sont avérés efficaces pour diagnostiquer les patients Fabry chez les personnes atteintes d'insuffisance rénale terminale<sup>370</sup>, d'hypertrophie cardiaque inexplicée ou

d'accidents vasculaires cérébraux chez des patients jeunes sans facteurs prédisposants évidents<sup>370-372</sup>. Le dépistage des patients atteints d'athérosclérose ou le dépistage ophtalmologique peuvent avoir moins de valeur.

Les formes atypiques présentent peu ou pas de symptômes caractéristiques de la maladie classique, mais ont des manifestations confinées principalement à un organe<sup>373</sup>. Se présentant beaucoup plus tard dans la vie (de la quatrième à la sixième décennie) que les patients atteints d'une maladie classique, ils sont souvent identifiés par hasard. Contrairement à leurs homologues classiquement affectés, les formes atypiques ont une activité  $\alpha$ -galactosidase A résiduelle qui varie entre 2 et 20 % de la normale<sup>374</sup>.

#### Forme cardiaque

La forme cardiaque - la plus largement rapportée parmi les formes atypiques - présente des manifestations cardiaques en l'absence d'atteinte systémique manifeste<sup>369,373</sup>. Les manifestations comprennent une cardiomégalie, des anomalies électrocardiographiques compatibles avec une cardiomyopathie, une cardiomyopathie hypertrophique non obstructive et des infarctus du myocarde ; une protéinurie légère peut également être détectée.

La forme cardiaque était initialement considérée comme rare, mais une étude japonaise portant sur 1603 hommes subissant une échocardiographie de routine a révélé que 3% des 230 patients atteints d'hypertrophie ventriculaire gauche avaient une maladie de Fabry cliniquement insoupçonnée<sup>369</sup>. Il apparait que la maladie de Fabry devrait également être envisagée dans tous les cas de cardiomyopathie hypertrophique homogène inexplicée<sup>375</sup>.

#### Forme rénale

Il existe également des rapports d'hommes hémizygotés avec des manifestations de la maladie confinées au rein. Les cas de maladie de Fabry peuvent être sous-diagnostiqués chez les patients sous dialyse rénale et transplantés<sup>376,377</sup>. Leur détection précoce est importante car ces patients peuvent développer ultérieurement une maladie vasculaire, cardiaque ou cérébrale et car un traitement peut être mis en place.

### 4. Corrélation phénotype-génotype

Comme dans d'autres maladies héréditaires du métabolisme, le phénotype dépend généralement de l'activité enzymatique résiduelle, qui à son tour dépend du type de variant. En général, les variants dits sévères qui entraînent une activité enzymatique inférieure à 1% conduisent à la forme classique, tandis

que celles qui entraînent une activité entre 1 et 30 % de l'activité normale, conduisent à des formes atypiques<sup>370,378,379</sup>.

Dans le *Fabry Outcome Survey* (FOS) une corrélation positive très significative a été retrouvée entre l'âge à l'entrée dans le FOS et le *FOS Severity Index* ainsi qu'entre l'âge à l'entrée dans le FOS et le nombre d'organes affectés ( $p < 0,001$ ) chez les hommes porteurs de variants pathogènes faux-sens *GLA*, indépendamment du fait que l'acide aminé modifié soit un acide aminé conservé ou non<sup>380</sup>.

Cependant, l'analyse des corrélations génotype-phénotype dans la maladie de Fabry est compliquée par un certain nombre de facteurs, tels que la forte proportion de variants privés, la grande hétérogénéité phénotypique intra et interfamiliale associée à un même variant et les complications liées à la maladie observées avec une prévalence élevée dans la population générale<sup>246,381,382</sup>. Ainsi, si certains variants sont habituellement associés à des formes atypiques (rénale ou cardiaque par exemple pour le variant N215S) ou à des formes classiques, cela n'exclut pas une forme différente chez certains de ces patients.

## 5. La maladie de Fabry chez les femmes

Compte tenu du mode de transmission lié à l'X, les manifestations cliniques de la maladie de Fabry chez les femmes hétérozygotes, en tant que porteuses obligatoires, ont longtemps été considérées comme rares ou bénignes. Cependant, la prévalence des femmes porteuses symptomatiques est estimée à environ 70 %, avec des phénotypes allant d'atteintes très légères aux cas graves comparable aux phénotypes présentés par les garçons<sup>383-388</sup>.

Les femmes Fabry présentent généralement des symptômes d'apparition tardive, une progression plus lente de la maladie et une espérance de vie plus longue, estimée à environ 70 ans, contre 50 à 55 ans pour les hommes<sup>389,390</sup>. Des douleurs neuropathiques sont rapportées chez environ 10 % des porteuses, le plus souvent par intermittence et souvent diagnostiquées à tort comme polyarthrite ou périartérite noueuse<sup>391</sup> ; la cornée verticillée est présente chez environ 72 % des femmes, tandis qu'une surdité est rapportée dans environ 33 % des cas<sup>392,393</sup>. Les autres symptômes rapportés dans environ 33 % des cas sont une atteinte rénale et une protéinurie, nécessitant une dialyse ou une transplantation rénale dans 10 % des cas<sup>393-395</sup>. Selon le FOS, 65 % des femmes atteintes développent une atteinte cardiaque, incluant une ischémie cardiaque d'origine microvasculaire, une cardiomyopathie hypertrophique et des arythmies (bloc auriculo-ventriculaire, tachyarythmies et anomalies du segment ST/onde T) qui peuvent nécessiter l'implantation d'un stimulateur cardiaque<sup>246,396,397</sup>. L'atteinte cardiaque est corrélée à l'âge ; en particulier, Kampmann *et al.* ont

rapporté la présence d'une cardiomyopathie chez environ 56 % des femmes hétérozygotes âgées de moins de 38 ans, chez 86 % de celles âgées de plus de 38 ans et chez 100 % des porteuses âgées de plus de 45 ans<sup>335</sup>.

Niemann *et al.* ont mis en évidence une nette différence de cardiomyopathie de Fabry entre les hommes et les femmes, évaluée par IRM cardiaque<sup>398</sup>. Contrairement aux patients hommes, la perte de la fonction myocardique et le développement de la fibrose n'étaient pas nécessairement liés à une hypertrophie myocardique chez les femmes.

Les patients des deux sexes connaissent une qualité de vie considérablement réduite à partir de la troisième décennie de la vie. Les femmes porteuses de Fabry ont un risque significatif d'atteinte d'organes majeurs et de diminution de la qualité de vie, et doivent donc être étroitement surveillées pour une évaluation précise des signes et des symptômes, ainsi que la mise en place d'un traitement adéquat<sup>252</sup>.

## VIII. Diagnostic

L'apparition précoce des signes et symptômes de la maladie de Fabry justifie un diagnostic rapide, d'autant plus du fait de la disponibilité de traitements. Cependant, reconnaître les manifestations précoces dans la pratique clinique peut être difficile pour diverses raisons. La présentation de la maladie est généralement hétérogène, les symptômes sont souvent peu spécifiques et une dysfonction rénale ou cardiaque majeure est rare chez les patients pédiatriques. Les formes à début pédiatriques sont très probablement sous-diagnostiquées car les symptômes sont frustrés. Les délais diagnostiques peuvent encore être considérables – plusieurs années voire plus d'une décennie – malgré les efforts de sensibilisation des praticiens, et les patients doivent souvent consulter plusieurs spécialistes avant de pouvoir obtenir un diagnostic. Si l'examen clinique fait suspecter une maladie de Fabry, en cas de douleurs neuropathiques ou d'association de symptômes, une confirmation biochimique et/ou génétique appropriée est nécessaire<sup>399</sup> (**Figure 48**).

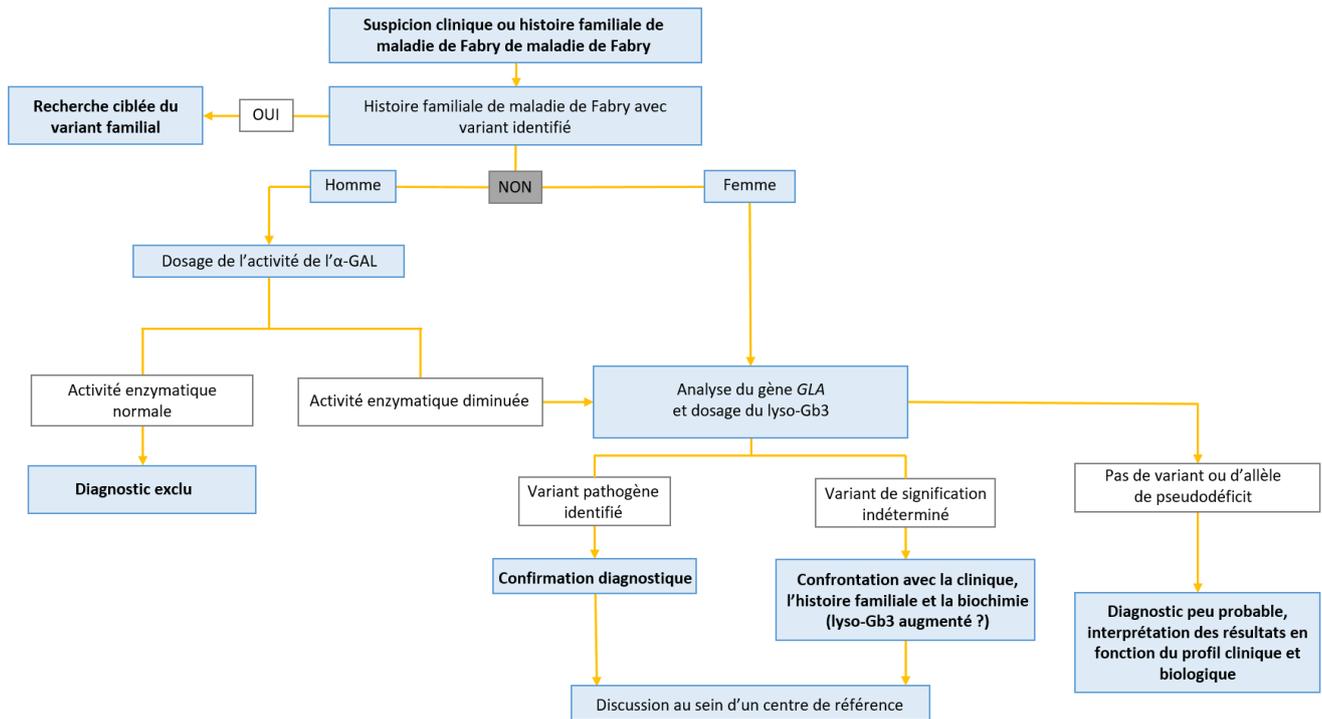


Figure 48. Algorithme diagnostique de la maladie de Fabry chez l'homme et la femme. D'après <sup>399</sup>et Mayo Clinic Laboratories (<https://www.mayocliniclabs.com/articles/resources/algorithms>)

## 1. Dosage enzymatique

La mesure de l'activité enzymatique de l'α-GAL constitue la première étape diagnostique. Elle peut être réalisée sur plasma, leucocytes ou tache de sang séché sur buvard. L'activité peut être dosée par fluorimétrie ou spectrométrie de masse. Une activité enzymatique effondrée permet de confirmer sur le plan biochimique une maladie de Fabry. Une activité résiduelle peut être retrouvée chez les patients avec une forme non-classique. Une activité enzymatique normale ne permet cependant pas d'éliminer une maladie de Fabry chez les femmes, même atteintes de forme classique<sup>327</sup>. En fonction des pratiques, certains laboratoires ne réalisent donc pas le dosage de l'activité enzymatique chez les femmes.

## 2. La génétique

L'examen de confirmation – et de première intention chez les femmes – est l'analyse par biologie moléculaire du gène *GLA*, effectué aujourd'hui par séquençage haut débit (NGS). Cette analyse est possible à partir d'ADN extrait d'un tube de sang total (prélevé sur tube EDTA) ou de taches de sang séché sur buvard.

Il existe une variabilité phénotypique avec un même variant, mais certaines sont associées aux formes classiques et d'autres aux formes tardives ou atypiques. La confirmation génétique est nécessaire pour le conseil génétique et l'identification de la maladie chez les apparentés. Identifier le variant est également nécessaire sur le plan thérapeutique pour utiliser le migalastat, une chaperonne pharmacologique, qui n'est prescrit que lorsque le variant le permet<sup>400</sup>. Un tableau clinicobiologique de maladie de Fabry, sans variant identifié sur les exons, doit faire rechercher un variant intronique<sup>401</sup>.

### 3. Les biomarqueurs spécifiques

La maladie de Fabry étant due à un déficit enzymatique, le dosage du substrat accumulé constitue un outil diagnostique majeur.

Historiquement, le biomarqueur utilisé était le Gb3. Le dosage du Gb3 urinaire était plus fiable, notamment chez les femmes<sup>270</sup>, mais n'était pas élevé chez certains patients présentant des variants tardifs et/ou des variants particuliers (comme le variant p.Asn215Ser ou N215S plutôt associé à des formes cardiaques)<sup>402</sup>.

Actuellement le dosage du lyso-Gb3 est le biomarqueur consacré, étant plus sensible et plus spécifique que le Gb3<sup>403</sup>. Il peut être dosé dans le plasma ou sur tache de sang séché par spectrométrie de masse. La concentration plasmatique de lyso-Gb3 est corrélée à la sévérité du phénotype<sup>274</sup>. Une concentration élevée suggère un phénotype classique. *A contrario*, la concentration de lyso-Gb3 n'est jamais élevée chez les patients ayant un variant non pathogène du gène *GLA*<sup>404</sup>. Chez la femme, le lyso-Gb3 n'est rapporté comme élevé que dans 40 à 60 % des cas mais ce chiffre prend en compte la population pédiatrique. Or il a été montré que les concentrations de lyso-Gb3 sont dans les valeurs physiologiques pendant l'enfance et augmentent avec l'âge<sup>273</sup>. Chez l'adulte, des études montrent que la mesure combinée de l' $\alpha$ -GAL et du lyso-Gb3 plasmatique augmente la valeur diagnostique chez les femmes adultes symptomatiques<sup>405</sup>. Cependant, le lyso-Gb3 plasmatique est parfois lui aussi normal en cas de variant cardiaque avec le variant N215S<sup>406</sup>.

Concernant le suivi de la maladie et de la réponse aux traitements, les niveaux de lyso-Gb3 ne semblent pas diminuer chez tous les patients traités par molécule chaperonne, et chez certains patients atteints de Fabry classique, les niveaux de lyso-Gb3 ont considérablement augmenté et l'activité enzymatique résiduelle était très faible après le remplacement de l'ERT au migalastat<sup>407-409</sup>.

De nombreuses études ont démontré le rôle du lyso-Gb3 en tant que biomarqueur spécifique de l'activité de la maladie, en tant qu'outil de dépistage, de diagnostic et en tant que marqueur de réponse au traitement. Cependant, à ce jour, aucune donnée à long terme n'est disponible sur les

résultats cliniques des patients obtenant une diminution du lyso-Gb3. Au total, dans le cadre du diagnostic, le lyso-Gb3 a une très bonne valeur prédictive positive, une valeur prédictive négative moindre notamment chez les femmes et dans les formes atypiques et n'est pas un bon marqueur de suivi.

D'autres biomarqueurs ont été proposés tels que les analogues du lyso-Gb3<sup>410</sup> ou différents substrats de la voie de dégradation des sphingolipides (isoformes du Gb3 ou du Gb2, lactosylcéramide)<sup>411,412</sup>. Cependant les méthodes de séparation et d'analyse de ces métabolites ne sont pas adaptées aux analyses de routine.

#### 4. Les autres biomarqueurs

Il existe différents médiateurs de l'inflammation, du stress oxydatif et de l'apoptose, induits par l'accumulation initiale du substrat. Ils sont impliqués dans différents processus pathophysiologiques de la maladie et sont liés à la fois à une atteinte systémique et à des altérations tissulaires spécifiques.

Le dosage de ces différents médiateurs ainsi que le dosage de biomarqueurs plus conventionnels liés aux atteintes d'organes (calcul du débit de filtration glomérulaire, mesure de la protéinurie, dosage du NT-proBNP, de la troponine T cardiaque hypersensible, etc.) permettent de réaliser le bilan des complications au diagnostic et de suivre l'évolution de la maladie et la réponse au traitement (**Figure 49**). Ces marqueurs sont d'autant plus indispensables que la réduction du lyso-Gb3 n'exclut pas une évolution de la maladie. Inversement, certains traitements ne permettent pas de réduire le lyso-Gb3 qui n'est donc plus un marqueur fiable de suivi. Cependant, la recherche de nouveaux biomarqueurs ou de profils de biomarqueurs avance grâce aux sciences omiques.

La surveillance de biomarqueurs spécifiques d'organes complémentaires doit être utilisée chez tous les patients atteints de maladie de Fabry, en particulier chez les femmes et les patients traités par thérapie chaperon<sup>413-415</sup>.

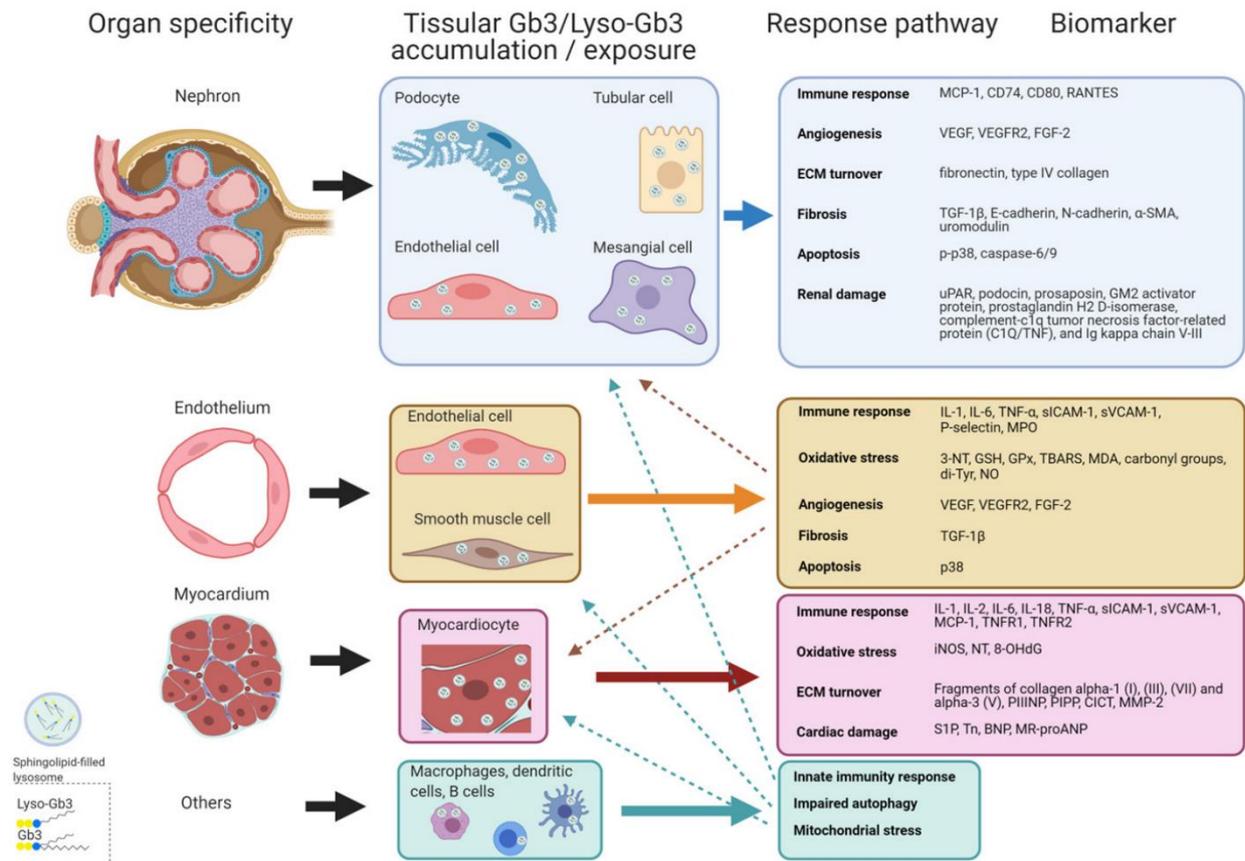


Figure 49. Schéma des voies de réponse pathogènes.

Voies de réponse favorisées par l'accumulation et/ou l'exposition au Gb3 et/ou au lyso-Gb3 dans la maladie de Fabry regroupées par spécificité d'organe/tissu, avec certains biomarqueurs impliqués. Les flèches en pointillé indiquent les associations entre la vasculopathie systémique et l'atteinte rénale et cardiaque.  $\alpha$ -SMA :  $\alpha$ -smooth muscle actin ; BNP : brain natriuretic peptide ; CICT : collagen type I carboxy-terminal telopeptide ; FGF-2 : fibroblast growth factor-2 ; Gb3 : Globotriaosylceramide ; GSH : glutathione ; GPx : glutathione peroxidase ; MCP-1 : monocyte chemo-attractant protein ; MDA : malondialdehyde ; MMP-2 : matrix metalloproteinase-2 ; MPO : myeloperoxidase ; MR-proANP : midregional pro-atrial natriuretic peptide ; NO : nitric oxide ; NT : nitrotyrosine ; 8-OHdG : 8-hydroxydeoxyguanosine ; PIPP : procollagen type I carboxy-terminal propeptide ; PIIINP : procollagen type III amino-terminal propeptide ; sICAM-1 : soluble intercellular adhesion molecule 1 ; sVCAM-1 : soluble vascular cell adhesion molecule 1 ; S1P : Sphingosine-1-phosphate ; TBARS : thiobarbituric acid reactive species ; TGF $\beta$ -1 : transforming growth factor beta-1 ; TNF- $\alpha$  : tumor necrosis factor alpha ; TNFR : tumor necrosis factor receptor ; Tyr : tyrosine ; uPAR : urokinase-type plasminogen activator receptor ; VEGF : vascular endothelial growth factor ; VEGFR : vascular endothelial growth factor receptor. <sup>416</sup>

## 5. Dépistage

### Dépistage dans les populations à risque

Le dépistage des populations à haut risque permet d'identifier des patients qui pourront bénéficier d'une prise en charge thérapeutique spécifique et d'une surveillance adaptée afin de prévenir d'autres atteintes d'organes. Dans ces populations à haut risque (patients avec une hypertrophie ventriculaire gauche, un AVC jeune, une néphropathie sans facteur de risque, etc.), la prévalence des individus avec

un variant GLA est de 0,62% (en incluant les VSI) et celle des individus avec un diagnostic définitif de maladie de Fabry est de 0,12%<sup>417</sup>.

L'élargissement du dépistage des populations à haut risque en cardiologie, neurologie et néphrologie à l'ophtalmologie, la gastro-entérologie, la médecine interne, la pédiatrie, la dermatologie et la génétique médicale permet d'augmenter le taux diagnostique de la maladie de Fabry<sup>418</sup> (**Figure 50**).

La sensibilisation des différents spécialistes à cette maladie rare, multisystémique, mais traitable est donc essentielle afin de réduire les délais de diagnostic et d'améliorer la qualité de vie des patients.

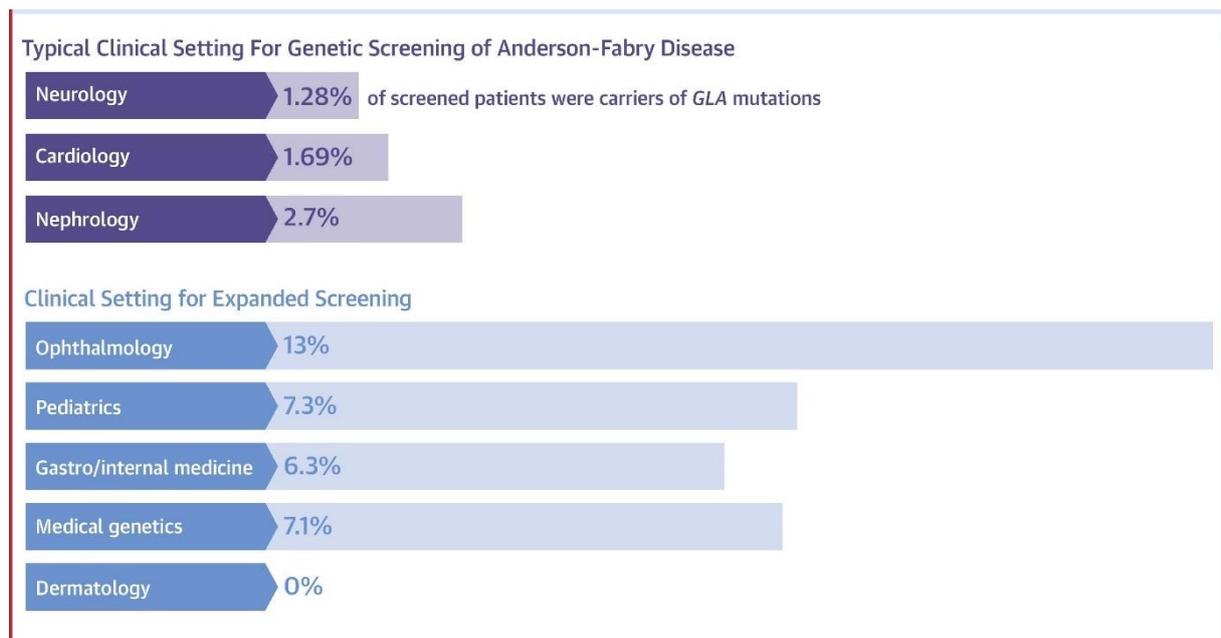


Figure 50. Extension du dépistage de la maladie de Fabry.<sup>418</sup>

### Dépistage néonatal

Plusieurs études pilotes et programmes de dépistage néonatal de la maladie de Fabry ont été mis en œuvre dans le monde. Ces programmes varient en fonction du coût économique du dépistage, de l'expertise et des intérêts locaux, des décisions politiques et des demandes des associations de patients et familles mais ils ont démontré la faisabilité du dépistage néonatal pour cette pathologie. En fonction des pays et des programmes, le dépistage est réalisé par dosage biochimique ou méthode moléculaire à haut débit<sup>419-421</sup>.

Une particularité de ce dépistage est que la valeur prédictive positive ne peut pas être utilisée comme mesure de performance du fait de la difficulté à définir les vrais positifs, en raison de l'incertitude quant à l'apparition des symptômes de la maladie. Il en est de même pour les faux positifs. On peut

obtenir le rapport entre le nombre de tests positifs et le nombre de nouveau-nés dépistés, mais ici aussi, le nombre de tests positifs dépendra de la valeur seuil choisie par chaque laboratoire<sup>209</sup>.

Une fois le diagnostic confirmé, il a été proposé de faire suivre le nourrisson par un spécialiste tous les 6 mois afin de surveiller l'apparition de symptômes. Pour les enfants avec un variant associé à une forme tardive, la fréquence et la stratégie de suivi doivent être adaptées<sup>422</sup>.

Les programmes de suivi à long terme permettront une meilleure connaissance de l'histoire naturelle, l'établissement de stratégies pour le suivi, du moyen optimal de surveillance et d'un calendrier de mise en place du traitement, et un suivi au long cours de la réponse aux thérapies notamment dans le cadre de traitements mis en place précocement.

Un aspect fondamental du dépistage néonatal est la possibilité d'un dépistage familial après identification de nouveau-nés positifs. La combinaison d'une analyse généalogique détaillée et d'un test génétique en cascade des membres de la famille à risque peut augmenter le nombre de patients identifiés, améliorer le diagnostic précoce et clarifier la pathogénicité des nouveaux variants *GLA*<sup>423</sup>. Dans plusieurs études, il est rapporté qu'aucun des nourrissons atteints de Fabry identifié par le dépistage néonatal n'avait pas d'antécédents familiaux positifs de maladie de Fabry ou de parents présentant des symptômes évocateurs de la maladie<sup>424,425</sup>. Cependant, lorsqu'un dépistage génétique familial était effectué, toutes les familles étudiées avaient des membres non diagnostiqués auparavant, symptomatiques ou non<sup>207,424</sup>. En moyenne, 4 à 5 membres affectés supplémentaires peuvent être identifiés par proposant<sup>423,426</sup>.

Le dépistage néonatal de la maladie de Fabry présente donc plusieurs avantages : des méthodes fiables et efficaces pour le dépistage sur tache de sang séché sur buvard sont disponibles ; la maladie est plus répandue que précédemment estimée cliniquement ; le dépistage néonatal permet un diagnostic et un traitement précoces, conduisant à un meilleur pronostic et en évitant à l'enfant une « odyssée diagnostique » de parfois plusieurs années ; de plus, le diagnostic d'un nouveau-né peut être suivi d'un conseil familial et d'un dépistage.

Mais celui-ci reste controversé du fait de plusieurs inconvénients : l'incidence élevée des formes d'apparition tardive a soulevé des questions éthiques. La détection en période néonatale peut avoir un impact psychologique négatif sur les parents et risque de créer des « enfants vulnérables » ou des « patients en attente », étiquetés et surmédiqués<sup>427,428</sup>. De plus, cela augmente les coûts des analyses de laboratoire et des visites de suivi. Le dépistage de la FD révèle également une forte prévalence d'individus atteints de VUS ou de nouvelles variantes génétiques non encore classées<sup>429</sup>. Les tests enzymatiques ne sont pas fiables pour le dépistage des femmes. Les faux négatifs avec les tests enzymatiques sont d'environ 40 % (jusqu'à 80 % à Taïwan, où le variant IVS4 est prédominant), alors

que les méthodes basées sur l'ADN semblent être plus sensibles et fiables<sup>430-432</sup>. Dans la plupart des pays, l'hétérogénéité mutationnelle entrave cependant l'utilisation de l'analyse moléculaire pour le dépistage à haut débit.

Malgré ces limitations, l'opinion des patients Fabry sur le dépistage néonatal est favorable. Plusieurs études ont exploré l'opinion des malades Fabry et d'autres maladies à apparition tardives. La plupart des participants ont une opinion favorable du dépistage néonatal et estiment qu'il pourrait entraîner une meilleure santé actuelle, éliminer les errances diagnostiques, conduire à un traitement plus rapide et plus efficace et à des décisions de vie différentes, y compris des décisions sur le mode de vie, les finances et la procréation<sup>433-435</sup>.

## 6. Conseil génétique

Contrairement à la grande majorité des maladies lysosomales, qui sont héritées de manière autosomique récessive, la maladie de Fabry, comme la mucopolysaccharidose de type II (maladie de Hunter) et la maladie de Danon (déficit en LAMP-2), est de transmission liée à l'X<sup>389</sup>. Par conséquent, il n'y a pas de transmission d'homme à homme de la maladie de Fabry, mais les pères affectés transmettront le gène défectueux à toutes leurs filles, tandis que les femmes hétérozygotes ont un risque de 50 % à chaque conception de transmettre le gène ; les fils qui héritent du gène pathogène de leur mère auront la maladie, tandis que les filles seront des hétérozygotes qui peuvent ou non développer des manifestations de la maladie. Il est à noter que les cas de femmes atteintes de maladie de Hunter ou de Danon restent anecdotiques.

Une fois le diagnostic confirmé, il convient de demander l'avis d'un généticien et de réaliser un dépistage familial<sup>436</sup>. L'analyse de l'arbre généalogique et le dépistage efficace de la famille d'un patient diagnostiqué (adulte) sont susceptibles d'aboutir à l'identification de plusieurs membres de la famille touchés jusque-là non reconnus, y compris de jeunes patients à un stade relativement précoce de leur maladie<sup>389,426</sup>. Cela offre la possibilité d'offrir un conseil génétique et une intervention thérapeutique précoce<sup>426</sup>. Un soutien familial approprié doit être fourni, qui peut être obtenu avec l'aide d'associations de patients.

Le diagnostic prénatal de maladie de Fabry est controversé, pour les fœtus féminins mais aussi masculins du fait de la variabilité phénotypique, y compris intrafamiliale, et de la disponibilité de traitements.

## IX. Traitements

Une fois le diagnostic confirmé, les patients doivent être référés à un centre multidisciplinaire spécialisé dans la maladie de Fabry pour un examen initial, la planification et l'initiation du traitement. Les objectifs thérapeutiques suivants doivent être visés dans le cadre de la prise en charge multimodale : (1) Diminution des plaintes (notamment réduction de la douleur), (2) retarder/prévenir la progression des manifestations organiques (notamment rénales, cardiaques et du système nerveux central), (3) amélioration de la qualité de vie et (4) normalisation de l'espérance de vie<sup>263,437</sup>.

La reconnaissance précoce de l'atteinte d'organes, en particulier du cœur, des reins et du système cérébrovasculaire, est essentielle pour initier rapidement le traitement et prévenir des complications potentiellement irréversibles. Les enfants doivent être traités dès l'apparition des symptômes. Cependant, les garçons porteurs d'un variant classique doivent être traités dès l'âge de 8 à 10 ans, même sans symptômes<sup>438</sup>. Les recommandations internationales pour l'instauration d'un traitement spécifique chez les patients adultes hommes ou femmes et porteurs de variants classiques ou atypiques reflètent une approche thérapeutique personnalisée qui prend en compte l'histoire naturelle du phénotype spécifique de la maladie<sup>263,439</sup>.

Les options de traitement établies pour réduire l'accumulation de Gb3 à l'intérieur des lysosomes comprennent le remplacement de l'enzyme endogène  $\alpha$ -GAL déficiente par une enzyme recombinante (enzymothérapie substitutive ou *enzyme replacement therapy*, ERT) et l'augmentation de la disponibilité de l'enzyme  $\alpha$ -GAL à l'intérieur des lysosomes en corrigeant le mauvais repliement de l' $\alpha$ -GAL par une molécule chaperonne (**Figure 51**).

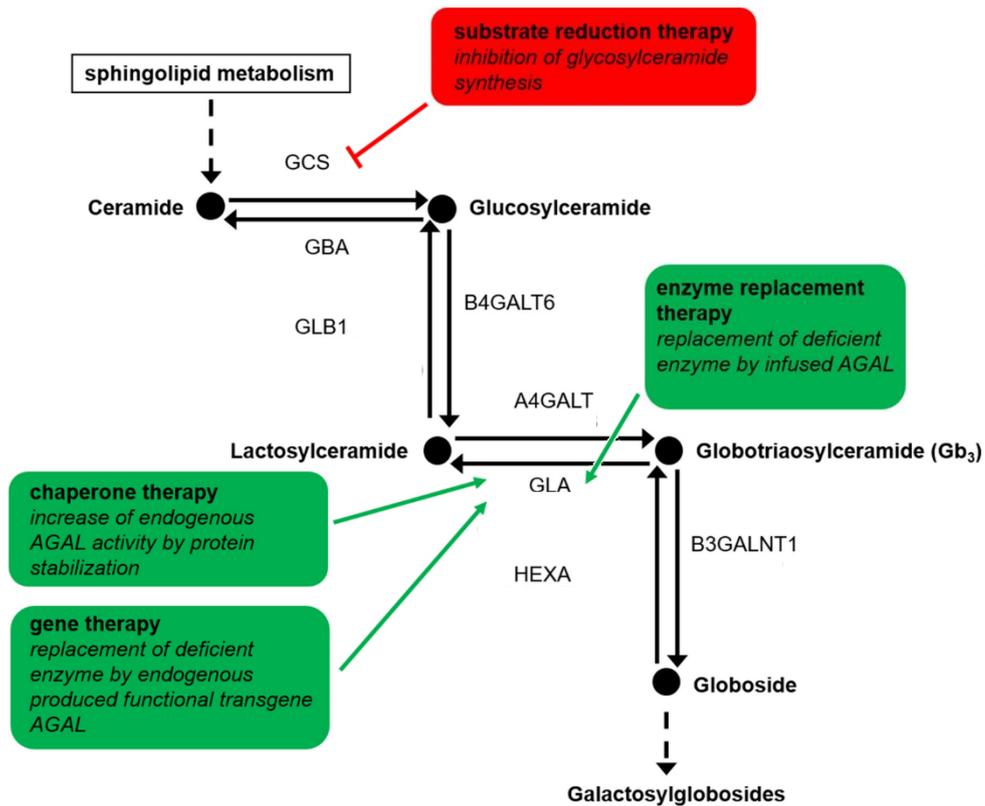


Figure 51. Vue d'ensemble de la voie des céramides et des cibles thérapeutiques des traitements spécifiques de la maladie de Fabry.<sup>440</sup>

Le **Tableau 8** résume le mécanisme d'action et les effets physiologiques des médicaments disponibles et expérimentaux pour le traitement de la maladie de Fabry.

Tableau 8. Médicaments disponibles et expérimentaux pour le traitement de la maladie de Fabry avec leur mécanisme d'action, voie d'administration et effets physiologiques.<sup>441</sup>

Drug Name	Mechanism of Action	Route of Administration	Physiological Effect
Agalsidase-β	ERT	Intravenous infusion	Decreases accumulation of GL3
Agalsidase-α	ERT	Intravenous infusion	Decreases accumulation of GL3
Pegunigalsidase-α	ERT	Intravenous infusion	Decreases accumulation of GL3
Migalastat	Binds reversibly to the active site of the amenable mutant of α-GAL	Oral	Promotes trafficking of α-GAL to lysosome, thus increasing enzyme activity
<i>Investigational drugs</i>			
Moss α-GAL	Moss derived α-GAL	Intravenous infusion	Decreases accumulation of GL3

Lucerastat	Glucosylceramide synthase inhibitor	Oral	Reduces accumulation of glycosphingolipids, including GL1 and GL3
Venglustat	Glucosylceramide synthase inhibitor	Oral	Reduces accumulation of glycosphingolipids, including GL1 and GL3

En France, un protocole national de diagnostic et de soins (PNDS) a été rédigé par un groupe d'experts pour la maladie de Fabry. Il s'agit d'un référentiel de bonne pratique à destination des professionnels concernés décrivant la prise en charge diagnostique et thérapeutique optimale et le parcours de soins du patient. Il décrit le bilan initial, la prise en charge thérapeutique et le suivi de la maladie de Fabry. Une synthèse est disponible, à destination du médecin traitant. Il peut être retrouvé sur le site de la Haute Autorité de Santé (HAS) : [https://www.has-sante.fr/jcms/p\\_3301584/fr/maladie-de-fabry](https://www.has-sante.fr/jcms/p_3301584/fr/maladie-de-fabry)

### 1. Enzymothérapie substitutive

Brady *et al.* ont fait la première tentative en 1973 pour administrer l' $\alpha$ -GAL à deux patients Fabry<sup>442</sup>. L'enzyme était purifiée à partir de tissu placentaire humain. La perfusion avait été bien tolérée et avait amélioré l'activité enzymatique de 68 %. La purification de l' $\alpha$ -GAL à partir du placenta et de la rate était complexe et insuffisamment disponible ; les progrès de la biotechnologie ont permis la production d' $\alpha$ -GAL recombinante. Trois préparations, l'agalsidase- $\beta$  et l'agalsidase- $\alpha$  depuis 2001 et la pegunigalsidase- $\alpha$  depuis 2023, sont actuellement approuvées comme options pour le traitement à vie de la maladie de Fabry<sup>443</sup>.

L'ERT permet de prévenir l'apparition de l'hypertrophie cardiaque et cas d'hypertrophie déjà installée, de réduire la masse du ventricule gauche et d'améliorer la fraction d'éjection; de stabiliser le débit de filtration glomérulaire ; de retarder le premier évènement clinique (rénal, cardiaque, cérébrovasculaire, décès) avec un bénéfice clinique plus important en cas d'initiation précoce du traitement ; d'éliminer l'accumulation de Gb3 des cellules endothéliales des capillaires dermiques et de réduire les symptômes gastro-intestinaux<sup>444-446</sup>.

#### a) *Agalsidase alpha*

L'agalsidase- $\alpha$  (Replagal, Takeda) est produite dans une lignée cellulaire humaine (cellules de fibrosarcome humain HT-1080) et est disponible sous forme de perfusion intraveineuse toutes les deux semaines à la dose recommandée de 0,2 mg/kg de poids corporel.

#### b) *Agalsidase beta*

L'agalsidase- $\beta$  (Fabrazyme, Sanofi) est produite dans des cellules ovariennes de hamster chinois et est disponible sous forme de perfusion intraveineuse toutes les deux semaines, avec une dose recommandée de 1,0 mg/kg de poids corporel.

Arends *et al.* ont comparé les effets de l'agalsidase- $\alpha$  et de l'agalsidase- $\beta$ <sup>447</sup>. Les patients traités avec l'agalsidase beta, en particulier les hommes atteints de forme classique, avaient une diminution plus significative du lyso-Gb3 plasmatique ( $\beta$  : -18 nmol/L,  $p < 0,001$ ) et de l'indice de masse du ventricule gauche (IMVG, OR 2,27,  $p = 0,03$ ), tandis que les pentes du DFG et le taux d'événements (HR 0,96,  $p = 0,87$ ) étaient similaires pour les deux enzymes. Le risque de développer des anticorps était plus élevé avec l'agalsidase beta (OR 2,8,  $p = 0,04$ ). Cela peut être lié à la dose ou à la méthode de fabrication du produit (par exemple, lignée cellulaire humaine contre lignée cellulaire CHO et les différences éventuelles de glycosylation)<sup>448</sup>. Cependant, son effet s'est poursuivi en présence d'anticorps. Tsuboi *et al.*, dans une étude observationnelle de 11 patients, ont démontré qu'il était possible de remplacer le traitement par agalsidase- $\beta$  par l'agalsidase- $\alpha$  sans risque et sans perte d'efficacité<sup>449</sup>. C'est donc une option thérapeutique viable chez les patients présentant une réaction allergique liée à la perfusion d'agalsidase- $\beta$ .

Diverses études ont identifié les anticorps anti-agalsidase (AB) et étudié leur importance et leur effet sur l'activité enzymatique. Mauhin *et al.* ont montré que les IgG AB étaient présents chez 40 % des hommes exposés à l'agalsidase<sup>450</sup>. La présence d'AB était indépendante de la durée d'exposition (odds ratio (OR) = 1,1,  $p = 0,09$ ). Les AB étaient plus fréquents dans la maladie de Fabry classique que dans les autres phénotypes (58,6 % contre 6,7 %,  $p = 0,0005$ ). Les variants conduisant à des protéines  $\alpha$ -GAL tronquées (délétions, non-sens et mutations de décalage de cadre) étaient plus fréquemment associées aux AB que les variants faux-sens (55,6 % contre 12,0 %,  $p = 0,006$ ).

Lenders *et al.* ont évalué l'inhibition sérique de l'ERT<sup>451</sup>. Une inhibition a été notée chez 40 % des hommes traités à l'agalsidase, quel que soit le type d'ERT ( $\alpha$  ou  $\beta$ ). Lors d'une analyse rétrospective

longitudinale de 5 ans, l'inhibition de l'agalsidase était associée à des niveaux plus élevés de lyso-Gb3, à des scores de gravité de la maladie plus mauvais, à davantage de symptômes, à une plus grande masse du ventricule gauche ( $p = 0,02$ ) et à une fonction rénale plus faible ( $p = 0,04$ ).

Le **Tableau 9** décrit les recommandations européennes pour la mise en place de l'ERT et son arrêt.

Tableau 9. Recommandations pour l'initiation et l'arrêt de l'enzymothérapie substitutive chez les patients atteints de la maladie de Fabry.<sup>441</sup>

ERT : enzyme replacement therapy ; NYHA : New York heart association ; MWT : maximal wall thickness; CNS : central nervous system; AF : atrial fibrillation

Initiation of ERT	Discontinuation of ERT	Not a Candidate for ERT
Classical FD males: 16 years or older, even if they have no symptoms or clinical signs of organ involvement (Class IIB recommendation).	Noncompliance with >50 percent of treatments or patient request (Class 1).	
Classical FD males and females: as soon as there are early signs of FD organ involvement (kidney, heart, and/or CNS signs) and not fully explained by other pathology (Class I recommendation).	End-stage renal disease, without an option for renal transplantation, in combination with advanced heart failure (NYHA class IV)–Class IIA	Advanced cardiac disease with extensive fibrosis-Class I
Non-classical FD males: as soon as there are early signs of FD organ involvement (kidney, heart, and/or CNS signs) and not fully explained by other pathology (Class I recommendation).	End-stage FD or other comorbidities with a life expectancy of <1 year-Class IIB	End-stage renal disease, without an option for renal transplantation, in combination with advanced heart failure (NYHA class IV)–Class IIA
Non-classical FD females: early clinical signs consistent with FD (Class IIB recommendation)	The severe cognitive decline of any cause-Class IIB	End-stage FD or other comorbidities with a life expectancy of <1 year-Class IIB
Cardiac-specific criteria: myocardial hypertrophy (MWT > 12 mm) without (or only minimal signs of) fibrosis (Class I) or signs of cardiac rhythm disturbances, including sinus bradycardia, AF, and repolarization disorders (Class I)	Lack of response for 1 year when the sole indication for ERT is neuropathic pain while receiving maximum supportive care. An exception is classical FD males who are at high risk of developing clinical signs of organ involvement within a short time period (Class II B).	The severe cognitive decline of any cause-Class IIB

### c) Pégunigalsidase alfa

La pégunigalsidase alfa (PRX-102 ou Elfabrio, Protalix BioTherapeutics et Chiesi) est produite par un système d'expression de protéines de cellules végétales ProCellEx<sup>®441</sup>. Il s'agit d'une  $\alpha$ -galactosidase A recombinante à action prolongée, pégylée. La pégylation (ou PEGylation) est une modification post-traductionnelle consistant en la conjugaison de l'enzyme à des chaînes de polyéthylène glycol. Ce

procédé permet d'augmenter la masse moléculaire d'une protéine, sa solubilité, son immunogénicité et sa stabilité, en réduisant sa sensibilité aux enzymes protéolytiques<sup>452</sup>. Cette forme d'ERT d'origine végétale a donc été conçue pour augmenter la demi-vie plasmatique et réduire l'immunogénicité, améliorant ainsi l'efficacité. Elle est disponible sous forme de perfusion intraveineuse toutes les deux semaines, avec une dose recommandée de 1,0 mg/kg de poids corporel. Une étude d'extension en ouvert pour évaluer l'innocuité et surtout l'efficacité à long terme d'une dose de 2,0 mg/kg toutes les 4 semaines est en cours, ce qui permettrait d'espacer les perfusions et d'améliorer la qualité de vie des patients Fabry traités par ERT.

## 2. Molécule chaperonne : Migalastat

Un chaperon pharmacologique oral se lie à et stabilise l' $\alpha$ -GAL porteuse de variations favorables, facilitant ainsi le trafic de l'enzyme vers les lysosomes et augmentant l'activité enzymatique (**Figure 51**).

Le migalastat est la première option orale à long terme de sa catégorie pour les patients atteints de maladie de Fabry avec des variants *GLA* sensibles. Les données des essais cliniques démontrent son innocuité et son efficacité. Les données de variants sensibles peuvent être trouvées sur le site internet de Galafold (GALAFOLD® *GLA* Mutation Search. Available online:

<https://galafoldamenabilitytable.com/hcp> (accessed on 23 August 2022)).

ATTRACT, un essai clinique de phase III (NCT01218659), a démontré le rôle prometteur de la monothérapie par le migalastat par voie orale comme option de traitement alternative à l'ERT par voie intraveineuse. Le migalastat et l'ERT ont eu des effets similaires sur la fonction rénale et une réduction significative de l'indice de masse du ventricule gauche (IMVG) avec le traitement au migalastat (-6,6 g/m<sup>2</sup> [-11,0 à -2,2]), mais aucun changement significatif avec l'ERT<sup>453</sup>. Les événements rénaux, cardiaques et cérébrovasculaires étaient plus faibles chez les patients sous migalastat que sous ERT (29 % contre 44 %, respectivement). Dans une extension en ouvert de l'étude ATTRACT, Feldt-Rasmussen *et al.* ont montré que le migalastat était bien toléré et réduisait l'IMVG à 36 mois<sup>454</sup>.

## 3. Traitements symptomatiques

Les traitements symptomatiques ont une place prépondérante dans la prise en charge des patients Fabry et permettent de réduire les symptômes déjà présents au moment du diagnostic, ne répondant pas au traitement ou évoluant sous traitement. Une prise en charge multidisciplinaire est nécessaire

afin de prendre en charge les différentes atteintes d'organes (néphrologue, neurologue, cardiologue, psychologue ou psychiatre etc.).

#### 4. Nouveaux traitements

##### *a. Stratégies de réduction de substrat*

La thérapie de réduction du substrat se concentre sur l'inhibition de la synthèse du glucosylcéramide avec une réduction subséquente de l'accumulation de Gb3 dans les cellules. Un exemple est le Venglustat. Il s'agit d'un inhibiteur oral de la glucosylcéramide synthase (GCS) pour réduire la production de glucosylcéramide (Gb1), ce qui diminue par la suite la production et l'accumulation de Gb3 dans les cellules. D'autres molécules sont en cours d'étude, en mono- ou bithérapie associée à l'ERT<sup>441</sup> (**Figure 51**).

##### *b. La thérapie génique*

Le premier essai clinique d'une approche de thérapie génique a été enregistré en 1988 (NCT00001234). L'étude a inclus 120 patients atteints des maladies de Gaucher et de Fabry dans le but d'étudier l'effet thérapeutique de la transplantation de cellules souches hématopoïétiques autologues CD34+ génétiquement modifiées avec un vecteur rétroviral. Les travaux sur le développement de thérapies géniques dans les sphingolipidoses n'ont cependant repris qu'au milieu des années 2010.

D'autres approches de thérapie génique pour les sphingolipidoses se sont développées principalement dans deux directions, avec l'enregistrement d'essais cliniques utilisant soit des vecteurs basés sur des virus adéno-associés (AAV), soit la transplantation de cellules CD34+ transduites avec des vecteurs lentiviraux (LV). En raison de leur bon profil d'innocuité et des récents essais cliniques réussis qui ont conduit à l'enregistrement de plusieurs médicaments géniques, ces stratégies ont été largement développées<sup>245</sup> (**Figure 52**).

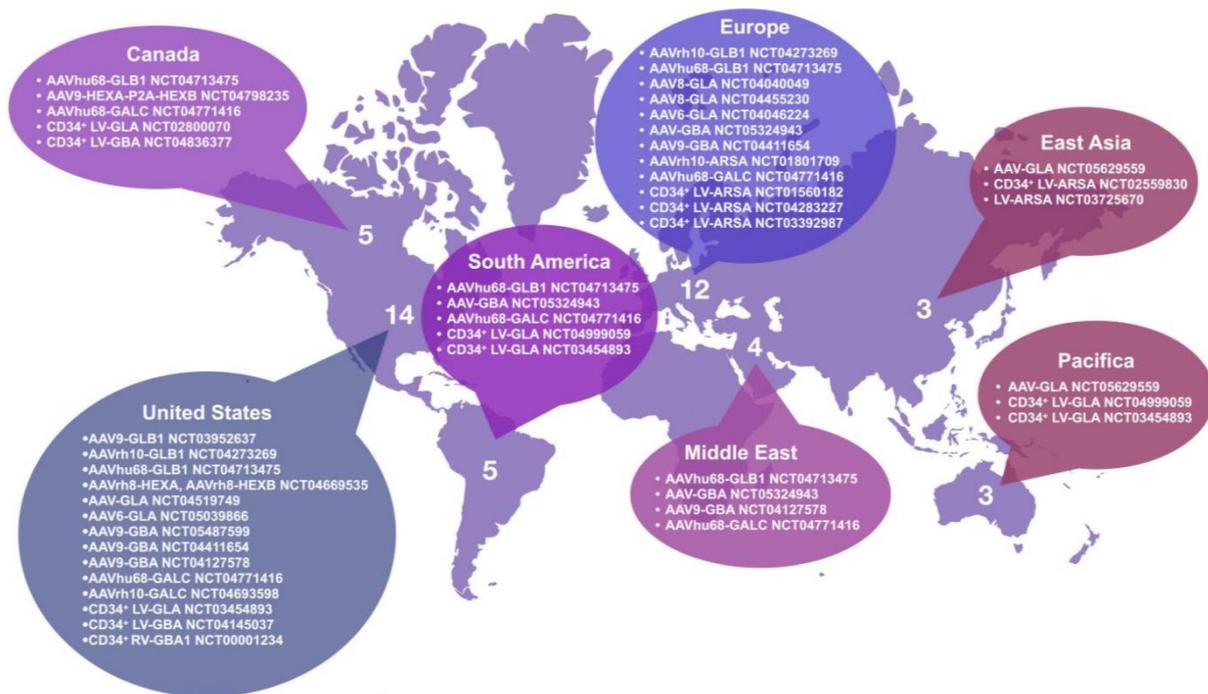


Figure 52. Localisation des essais cliniques pour le traitement de la maladie de Fabry et autres sphingolipidoses par thérapie génique. D'après <sup>245</sup>

### Thérapie génique médiée par l'AAV pour la maladie de Fabry

Six essais cliniques d'AAV codant pour le gène *GLA* sont actuellement en cours. L'AAV6 (NCT04046224 et NCT05039866) et de nouveaux sérotypes AAV modifiés ont été étudiés. La maladie de Fabry étant une maladie multisystémique, les vecteurs ont été administrés par voie intraveineuse dans toutes les études.

Des études précliniques utilisant un AAV2/6 codant pour le gène *GLA* humain ont été menées chez des souris atteintes de la maladie de Fabry. L'administration intraveineuse du vecteur a entraîné une augmentation significative de l'activité de l' $\alpha$ -GAL dans le plasma et les tissus, ainsi qu'une normalisation des taux de Gb3 et de lyso-Gb3<sup>455</sup>. Pour la recherche clinique, une version optimisée de ce vecteur (ST-920, isaralgagene civaparvovec, Sangamo Therapeutics) a été utilisée, ce qui a entraîné des niveaux plusieurs fois plus élevés que la normale d'activité  $\alpha$ -GAL dans le plasma et les tissus, et le vecteur a également montré un bon profil de sécurité (NCT04046224 et NCT05039866) ainsi qu'une réduction significative du lyso-Gb3 plasmatique et chez un des participant, une clairance des inclusions rénales de Gb3 et une réduction de la podocyture. Tous les participants ont arrêté l'ERT durant l'étude et n'ont pas repris le traitement. Ces résultats ont été présenté au WORLDSymposium 2023.

L'administration intraveineuse d'AAV8 ( $3 \times 10^{11}$  gv (génomme viral)/animal) codant pour le gène *GLA* humain chez des souris Fabry a entraîné un niveau plus élevé de production d'enzymes par rapport à

l'AAV2. Dans le même temps, l'accumulation de Gb3 a été complètement inhibée dans le foie, la rate, le cœur, les reins et le plasma des animaux, et une diminution de la neuropathie périphérique a été notée<sup>456</sup>. L'AAV8 est connu pour être le meilleur candidat pour la délivrance de gènes aux cellules hépatiques, avec une efficacité élevée confirmée dans de nombreuses études chez les rongeurs et les primates<sup>457</sup>. Ce sérotype a également été trouvé pour atteindre des taux de transduction plus élevés des hépatocytes humains par rapport aux autres sérotypes AAV<sup>458</sup>.

### Thérapie génique médiée par un lentivirus pour la maladie de Fabry

Trois essais cliniques LV ont été enregistrés pour la maladie de Fabry, tous impliquant la transplantation de CD34+ génétiquement modifiés avec des LV (NCT04999059, NCT03454893 et NCT02800070). Les premiers résultats d'une de ces études ont été publiés en 2021 par A. Khan *et al.* (NCT02800070)<sup>459</sup>. Les résultats de l'étude ont confirmé le profil d'innocuité robuste de la thérapie génique médiée par le LV. Dans l'étude, cinq patients masculins atteints de la maladie de Fabry âgés de 29 à 48 ans ont reçu une greffe de CD34+ génétiquement modifié avec des LV codant pour *GLA* à raison de 3,1 à 13,8 × 10<sup>6</sup>vg/kg. Le nombre de copies de vecteurs dans les cellules variait de 0,68 à 1,43 copies/génome. Après la transplantation, une diminution des taux plasmatiques de lyso-Gb3 a été observée chez quatre des cinq patients, et les taux plasmatiques de Gb3 étaient généralement stables chez tous les patients, à l'exception d'une augmentation ultérieure chez deux patients. Chez trois patients, des anticorps IgG contre l'enzyme ont été détectés à la suite d'une ERT réalisée avant la thérapie génique. Les patients ont montré une élimination presque complète ou une diminution des titres d'anticorps IgG contre l'enzyme après l'injection de la thérapie génique, sans résurgence des niveaux, malgré une exposition continue à l'enzyme des cellules transduites. Les auteurs ont suggéré que la thérapie génique pourrait réduire l'immunité préexistante résultant de l'ERT<sup>459</sup>.

### CRISPR-Cas9

Chang *et al.* ont utilisé CRISPR/Cas9 avec des ARN guides doublés pour « effacer » le variant IVS4+919G>A<sup>460</sup>. Dans des fibroblastes de patients Fabry, l'activité enzymatique  $\alpha$ -GAL a été considérablement augmentée et le Gb3 a été éliminé, prouvant ainsi une approche réalisable pour le traitement de la forme cardiaque lié à ce variant d'épissage.

## Limites et défis

Les approches de thérapie génique sont prometteuses ; néanmoins, ces méthodes innovantes nécessitent des recherches supplémentaires et des évaluations de sécurité approfondies. Un autre aspect important est le coût de ces médicaments. Les derniers médicaments géniques approuvés sont parmi les plus chers du marché mondial des médicaments<sup>461,462</sup>. Par conséquent, le processus de leur production nécessite une recherche et un développement optimaux, car ces thérapies avancées ne sont pas disponibles ou abordables pour de nombreux patients.

## X. Maladies rares et maladies complexes : Fabry et Parkinson

L'implication du SNC est fréquente dans la maladie de Fabry. L'atteinte la plus décrite est l'atteinte cérébrovasculaire, associée à la dysfonction endothéliale. Peu d'autres manifestations neurologiques ont été étudiées, telles que celles décrites dans d'autres maladies lysosomales comme la maladie de Gaucher par exemple. Peu de données sont disponibles concernant les atteintes neuronale et gliale dans la maladie de Fabry, indépendamment de l'atteinte vasculaire. Les molécules utilisées en enzymothérapie, disponible depuis 2001, ne traversent pas la barrière hémato-encéphalique, à l'inverse du migalastat, la molécule chaperonne : ses effets directs sur le SNC ne sont cependant pas connus<sup>463-465</sup>.

D'anciennes séries d'autopsies ont montré une accumulation de glycosphingolipides dans les cellules musculaires des vaisseaux cérébraux ainsi que dans le tissu neuronal, avec une distribution incluant notamment le mésencéphale, dont le *locus niger*<sup>466</sup>.

Malgré ces descriptions, de rares cas de syndrome extrapyramidal chez les patients Fabry n'ont été décrit que très récemment. Mais l'enzymothérapie semble avoir modifié l'histoire naturelle de la maladie avec une réduction des atteintes neurologiques liées au phénotype vasculaire et l'augmentation de l'espérance de vie, pouvant ainsi révéler d'éventuelles atteintes primaires du SNC.

L'application de techniques d'imagerie cérébrale avancées suggère la présence de prodromes de neurodégénérescence dans la maladie de Fabry, avec une atteinte particulière du système moteur sous la forme d'un phénotype extrapyramidal subclinique avec un ralentissement moteur et une instabilité posturale au premier plan, plutôt qu'une rigidité et des tremblements<sup>467,468</sup>. Les résultats de neuro-imagerie étayent l'hypothèse d'un phénotype neurodégénératif indépendant de l'atteinte cérébrovasculaire<sup>469</sup>.

Si le lien entre variants dans le gène *GBA* (gène de la maladie de Gaucher) et maladie de Parkinson (MP) est bien décrit – les variants hétérozygotes de *GBA* étant le facteur de risque génétique de MP le plus fréquent – d'autres déficits d'enzymes lysosomales sont associées aux syndromes extrapyramidaux en général, et la MP en particulier : le déficit en sphingomyélinase (*SMPD1*, maladie de Niemann-Pick de type A/B, une autre sphingolipidose) par exemple<sup>470,471</sup>.

Un possible lien entre la maladie de Parkinson et la maladie de Fabry a été signalé pour la première fois en 1994 avec la description de patients atteints de la maladie de Parkinson avec un diagnostic secondaire de maladie de Fabry<sup>472,473</sup>. Le possible mécanisme physiopathologique sous-jacent n'est pas élucidé. Il pourrait être lié aux dépôts de Gb3 ou bien aux lésions cérébrovasculaires au niveau du système dopaminergique nigrostriatal.

L'allongement de la durée de vie des patients Fabry grâce à l'enzymothérapie substitutive et un possible effet de la molécule chaperonne sur le SNC et la neurodégénérescence pourront peut-être permettre de mieux caractériser la relation entre Fabry et Parkinson et d'étayer les mécanismes biologiques impliqués<sup>474</sup>.

## XI. Registres Fabry

Le « *International Fabry Disease Registry* » (NCT00196742) existe depuis plus de 20 ans et a collecté les données démographiques et cliniques longitudinales de plus de 8000 patients atteints de la maladie de Fabry<sup>475</sup>. Ce registre, sponsorisé par le laboratoire Sanofi, a permis la publication de nombreux articles scientifiques qui ont contribué à élargir considérablement les connaissances sur l'apparition et la progression de la maladie de Fabry, sa prise en charge clinique, le rôle du sexe et de la génétique, l'identification de facteurs pronostics et les résultats de l'enzymothérapie substitutive par agalsidase beta (**Figure 53**). Il s'agit d'une étude observationnelle et dont les données sont soumises sur la base du volontariat.



Figure 53. Le registre Fabry : Utilisation de données du monde réel dans des collaborations multipartites mondiales<sup>475</sup>.

Une autre étude internationale observationnelle a également été débuté en 2001 : le « *Fabry Outcome Survey* » (FOS, NCT03289065, sponsorisé par le laboratoire Takeda)<sup>476</sup>. Vingt ans plus tard, près de 4500 patients ont été enrôlés dans 144 centres répartis dans 26 pays et près de 60 articles scientifiques ont été publiés. Les analyses des données FOS ont permis d'étudier l'efficacité et l'innocuité à long terme de l'enzymothérapie substitutive avec l'agalsidase alfa et ses effets sur la morbidité et la mortalité, ainsi que les avantages d'un traitement rapide et précoce avec l'agalsidase alfa sur la progression de la cardiomyopathie et le déclin de la fonction rénale associé à la maladie de Fabry.

Ces études longitudinales sont une source inégalée de données en vie réelle sur les patients et leur maladie. Cependant, il manque un registre indépendant de l'industrie pharmaceutique.



## CHAPITRE V : Les sciences omiques

### I. Définition, étymologie et historique

Ces dernières années, de nouvelles technologies avancées nous permettent d'explorer dans leur ensemble les molécules qui constituent le vivant. À chaque type moléculaire correspond une science omique (ou désignée par le suffixe « -omique », *omics* en anglais) : la génomique pour l'ADN, l'épigénomique pour la méthylation de l'ADN, la transcriptomique pour l'ARN, la protéomique pour les protéines, la métabolomique pour les métabolites. A cela s'ajoute le phénotype, la prise en compte du phénotype dans sa globalité (**Figure 54**). Les sciences omiques ont ainsi pour but la caractérisation et la quantification d'un type de molécules biologiques dans leur ensemble afin d'appréhender la structure, la fonction et la dynamique d'un organisme.

Le suffixe -ome est utilisé pour désigner les objets d'étude de ces domaines, tels que le génome, le protéome, le métabolome ou le transcriptome respectivement. « -ome » tel qu'il est utilisé en biologie fait référence à une sorte de « complétude » ou globalité. « -Ome » est dérivé d'une variante de la terminaison grecque -ωμα (« -oma »). Les premières utilisations de ce suffixe incluent biome en 1916 et génome en 1920<sup>477</sup>.

Un tournant historique est marqué vers la création des omiques lorsqu'en 1944 Erwin Schrödinger publie « Qu'est-ce que la vie ? », un essai de vulgarisation scientifique. Le propos de Schrödinger s'attache à la question : « comment la physique et la chimie peuvent-elles rendre compte des événements spatio-temporels qui se déroulent à l'intérieur des frontières d'un organisme vivant ? ». Il y introduit l'idée d'un « cristal aperiodique » où l'information génétique serait contenue dans la configuration des liaisons covalentes, anticipant ainsi la découverte de l'ADN.

La biologie moléculaire est ainsi une science transversale. La nouvelle discipline s'articule alors autour de la biochimie et de la génétique, avec les apports de la physique, de la chimie et de la biologie.

Les bioinformaticiens et les biologistes moléculaires seront parmi les premiers scientifiques à appliquer largement les suffixes « -ome »/« omique » dans le dernier quart du XX<sup>ème</sup> siècle. L'ère « omique » débutera au début des années 2000 avec l'annonce du séquençage complet du génome humain<sup>478</sup>.

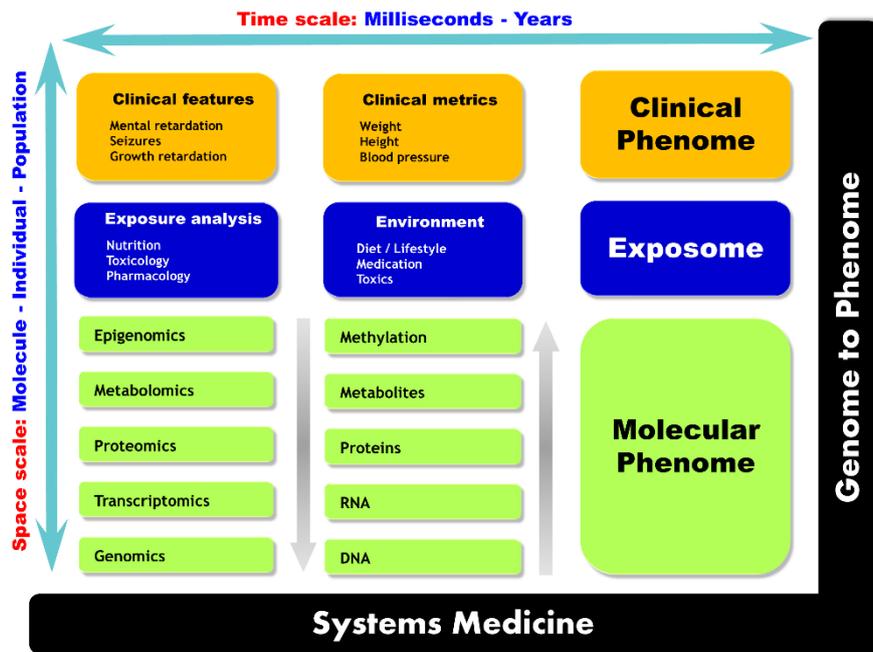


Figure 54. Vue d'ensemble de la biologie multi-échelle de la médecine systémique. <sup>479</sup>  
 Les différentes stratégies omiques permettent d'interroger ces supports pour la recherche d'informations.

## II. La biologie des systèmes

Depuis les années 70, une très bonne compréhension des éléments qui constituent les cellules, les tissus et les organes a été acquise à la faveur du développement des sciences du vivant. Grâce à la génétique et la génomique, les gènes de nombreux organismes, y compris humains, ont été entièrement séquencés et décodés. La biologie cellulaire et moléculaire a permis d'étudier la production, la fonction et l'organisation des protéines qui forment les systèmes subcellulaires comme le cytosquelette ou les organelles tels que les mitochondries ou le noyau. La physiologie, quant à elle, est axée sur l'étude des fonctions des cellules, des tissus, des organes et des organismes.

A l'aide de toutes ces connaissances acquises, il est possible de comprendre comment l'information contenue dans les gènes est décodée pour former des protéines, comment ces protéines interagissent entre elles et avec d'autres composants des cellules tels que les lipides, les sucres, les nucléotides, et comment cela s'intègre dans le fonctionnement de la cellule, du tissu et de l'organisme. La biologie des systèmes correspond à ces études intégrées.

La biologie est un terme très large dans le contexte, englobant la biologie moléculaire, la biologie cellulaire, l'organisation des tissus, des organes et leurs fonctions physiologiques.

Le mot « système » peut désigner différents niveaux d'organisation biologique : au niveau d'une cellule, au niveau d'un tissu ou d'un organe, ou au niveau d'un organisme entier. A l'autre extrémité de l'échelle, il peut également s'agir d'un système au niveau subcellulaire, comme la mitochondrie ou le noyau, par exemple.

La biologie des systèmes englobe donc la connaissance des composants moléculaires grâce à la chimie et à la biologie cellulaire, l'analyse des fonctions des composants individuels tels que les gènes, les protéines, etc., l'étude de la manière dont ils s'assemblent pour donner naissance à des systèmes subcellulaires – comme une voie de signalisation ou une voie métabolique – ou à une machinerie cellulaire – telles que le cytosquelette ou la machinerie électrique. Ces systèmes ou machineries forment des unités fonctionnelles capables d'opérations nécessaires aux fonctions physiologiques au niveau des tissus cellulaires et des organes, etc. Cette étude est réalisée grâce à des modèles dynamiques, qui eux-mêmes s'assemblent en de plus grands systèmes et ainsi de suite.

Le terme « Biologie des Systèmes » a commencé à être largement utilisé au début des années 2000. Avant cela, ce champ d'étude était souvent appelé « Systèmes Complexes ». C'est un terme très vague qui englobe les études, non seulement en biologie, mais aussi en physique, en chimie, et en sciences sociales, comme la sociologie, et même l'économie. Il existe certaines méthodologies, en particulier les analyses de réseaux, qui sont communes à tous ces domaines. Mais c'est un terme trop large pour être significatif.

La biologie des systèmes est née au cours de la première décennie du XXI<sup>ème</sup> siècle ; Cette naissance est liée à quelques articles clés. Par exemple, le développement de puces à ARN pour mesurer simultanément les niveaux de milliers d'ARNm, a permis de voir dès 1999 comment le transcriptome dans des fibroblastes humains en réponse à un stimulus<sup>480</sup>, préparant le terrain à la collecte de données à grande échelle.

La biologie des systèmes, surtout dans le contexte des systèmes mammifères, peut s'apparenter à la physiologie. En effet, la physiologie fournit une description quantitative des fonctions au niveau des tissus et des organes, comme par exemple la filtration de l'urine par le rein ou les activités électromécaniques du cœur. Si ces descriptions peuvent être très précises et constituer un point de départ essentiel dans la compréhension de la biologie des systèmes, elles n'englobent néanmoins pas les aspects moléculaires et génomiques qui donnent lieu aux fonctions physiologiques observées. Ainsi, contrairement à la physiologie, la biologie des systèmes utilise la biologie moléculaire et la biochimie des composants cellulaires pour comprendre comment les fonctions physiologiques au niveau des cellules, des tissus et des organes s'articulent.

La biologie des systèmes est donc un vaste domaine d'investigations, comprenant de nombreux champs d'exploration et de nombreuses sciences.

L'une des plus anciennes et des plus étudiées est la génomique. Le terme génome fait référence à l'ensemble des chromosomes, et la génomique considère les gènes dans le contexte du génome entier. Là où la génétique considère un gène par lui-même, quelles sont ses caractéristiques intrinsèques et comment elles affectent sa fonction, la génomique le considère dans le contexte d'un chromosome ou de tout un génome. La génomique explore les caractéristiques des gènes, tels que les polymorphismes de nucléotides uniques (SNPs), les variations du nombre de copies, les variations causales de pathologies, etc. ainsi que la façon dont les gènes interagissent et sont régulés au sein du génome. Le séquençage ou des puces à ADN permettent d'étudier les variations du génome dans son ensemble.

On peut considérer la génomique comme un des serre-livres de la biologie des systèmes. Tous les composants cellulaires, que ce soient les protéines, mais également la synthèse et la dégradation des lipides, peptides, métabolites etc., proviennent des caractéristiques spécifiées par le génome. L'autre extrémité de la biologie des systèmes, l'autre serre-livres, serait les fonctions physiologiques. La biologie des systèmes permet de comprendre comment les caractéristiques génomiques sont exprimées en termes de protéines et comment ces protéines peuvent ensuite être modifiées par des signaux environnementaux et d'autres perturbations pour donner naissance à des fonctions physiologiques dynamiques.

Le domaine de l'épigénomique s'intéresse à la méthylation de l'ADN et des protéines liées à l'ADN leur effet sur la régulation de l'expression des gènes, mais également plus récemment à l'organisation en trois dimensions de l'ADN avec l'avènement des domaines topologiquement associés (*topologically associated domains*, TAD).

Les puces (*microarrays*) et le séquençage permettent également le profilage transcriptionnel. Puisque les changements dans l'expression des gènes sont un moyen important pour les cellules de maintenir leur homéostasie et de changer d'état, les schémas d'expression de l'ARN sont essentiels pour notre compréhension de la régulation des systèmes.

La protéomique étudie de nombreuses protéines en simultané et mesure les changements dans les concentrations protéiques ou dans les états des protéines, tels que les changements dans les états de phosphorylation ou d'acétylation des protéines. La protéomique utilise le plus souvent comme technologie la spectrométrie de masse. Mais il existe également des « puces protéiques » qui utilisent des anticorps dirigés contre des protéines connues, dans le cadre de la protéomique ciblée.

La métabolomique est l'étude de l'ensemble des métabolites dans un organisme, un tissu ou des cellules. Le plus souvent, ces métabolites – lipides, sucres, nucléotides, etc. – sont étudiés dans le contexte d'un tissu ou d'un type cellulaire et de leur perturbation. La métabolomique implique en général l'utilisation de la spectrométrie de masse couplée à la chromatographie.

Cette discipline est indissociable des technologies qui permettent d'étudier ces nombreux composants ainsi que leurs variations.

Les nouvelles technologies omiques sont la marque de fabrique des approches expérimentales utilisées dans la biologie des systèmes. Ces approches expérimentales permettent de mesurer de nombreuses entités individuelles en simultanément. Des données de grand volume sont ainsi obtenues (*Big Data*). La discipline consacrée à leur organisation et leur analyse est la bioinformatique. Ces données peuvent être analysées à l'aide d'outils statistiques et mathématiques avancés.

Une combinaison d'approches expérimentales et de traitement bioinformatique peut fournir une compréhension plus approfondie de la façon dont les composants d'une cellule se réunissent pour interagir et donner naissance à des comportements au niveau cellulaire.

En ce qui concerne la bioinformatique et le traitement des données, plusieurs articles clés ont été publiés en 1999 : Bhalla *et al.* ont montré comment des propriétés pouvaient émerger de l'interaction entre les voies de signalisation biologique et comment ces propriétés, comme la commutation par exemple, pouvaient donner lieu à une fonction biologique<sup>481</sup>. Une autre propriété ayant émergé de ces systèmes est la robustesse : Alon *et al.* ont étudié la robustesse de la chimiotaxie bactérienne et ont effectué une combinaison d'expériences et de modélisation<sup>482</sup>. Ils ont ainsi pu montrer comment le système présente un comportement robuste en réponse à de nombreuses perturbations.

Ces expériences fournissent donc beaucoup d'informations et de données qui sont organisées de manière à pouvoir en extraire des connaissances à l'aide de la bioinformatique. De nombreuses bases de données sont disponibles publiquement, sont consultables, et peuvent être retraitées pour répondre à de nouvelles questions : GEO (ARN messagers), TargetScan (microRNA), Swiss-Port (protéines), DbGAP (*Genome Wide Association Studies*, GWAS), OMIM (gènes associés à des pathologies), Pharm GKB (médicaments), ...

Une corrélation statistique peut être réalisée entre les entités d'une base de données : on peut par exemple examiner tous les ARN messagers exprimés dans une condition spécifique, à la suite d'une perturbation spécifique ou à point temporel spécifique. Il est également possible de réaliser une corrélation statistique entre bases de données : par exemple combiner les bases de données OMIM et GEO et étudier l'effet des gènes mutés dans OMIM et les modèles d'expression d'ARNm dans les

maladies associées afin d'élucider la relation entre variation génétique et modèles d'expression de gènes.

A partir de ces données, il est possible de construire des réseaux : un réseau est la représentation d'un système en prenant en compte les éléments (par exemple les gènes) et leurs interactions. Les éléments, ou entités, sont appelés nœuds (*nodes*) et leurs relations arêtes (*edges*). Ces réseaux ainsi formés sont des systèmes connectés. Le domaine des mathématiques qui traite de ce type d'analyse de grands ensembles de données est appelé théorie des graphes (*graph theory*), ou analyse de réseaux, et permet de comprendre comment les systèmes sont organisés.

Un autre terme clé est le terme multidimensionnel. Dans le contexte de la biologie des systèmes, ce terme peut faire référence à plusieurs échelles d'organisation. Par exemple, les composants moléculaires forment des organites avec des machineries intracellulaires, la machinerie de transcription, de motilité des cellules, etc. Ces machineries et organites vont à leur tour former des cellules. Ces cellules forment des tissus et des organes qui interagissent et forment les organismes entiers. Ainsi, les niveaux croissants d'organisation donnent chacun naissance à de nouvelles propriétés et capacités. La biologie des systèmes implique l'étude de la façon dont ces nouvelles propriétés et capacités apparaissent. La compréhension de cette organisation à plusieurs échelles fait donc partie intrinsèque de l'étude de la biologie des systèmes.

Le terme multidimensionnel peut également faire référence à différentes échelles de temps : l'activité des canaux membranaires qui s'ouvrent et se ferment en l'espace de quelques millisecondes donnent lieu à des changements dans l'expression des gènes ou le statut épigénomique avec un effet sur des jours ou même des semaines ou des mois.

Une manière d'appréhender la biologie des systèmes dans son ensemble est de considérer une approche descendante (*Top-Down approach*) : cette approche part de la description du système dans son ensemble et offre une image globale et exhaustive du système. Cependant, les relations dans les modèles « de haut en bas » sont souvent définies par des corrélations et les inférences causales ne sont pas possibles à l'échelle à laquelle ces grands modèles sont décrits, ce qui en constitue une limite.

Un autre modèle, ou approche, est l'approche ascendante (*Bottom-Up approach*) qui commence avec des composants cellulaires tels que les gènes, les protéines, les lipides et les sucres et s'attache à comprendre comment les systèmes fonctionnels, tels que les machineries intracellulaires, sont assemblés, contrôlés et exploités. Les approches ascendantes ont été les plus courantes en biologie

moléculaire, biochimie et biologie cellulaire au cours des 50 dernières années. Cette approche est parfois appelée réductionniste, car elle commence par réduire le système à une composante clé, puis en partant de cette composante d'intérêt, elle étudie comment le reste du système se développe. L'approche ascendante fournit une compréhension mécanistique des systèmes. Mais, à mesure que les systèmes s'agrandissent, on peut se perdre dans les détails. On ne peut pas déchiffrer comment un petit détail, par rapport à un ou quelques composants, se rapporte au comportement des systèmes dans leur ensemble (« La feuille qui cache la forêt »).

Une combinaison de modèles ascendants (*Bottom-Up*) et descendants (*Top-Down*) est donc nécessaire pour obtenir une perspective utile en biologie des systèmes.

Au total :

- La biologie des systèmes s'appuie sur la physiologie, la biologie moléculaire, la biochimie et la biologie cellulaire pour comprendre comment les composants moléculaires interagissent les uns avec les autres pour former des unités fonctionnelles.
- Les expériences en biologie des systèmes impliquent souvent la mesure simultanée de nombreuses entités cellulaires telles que les gènes, les protéines, les lipides.
- Une caractéristique clé de la biologie des systèmes est l'intégration d'expériences et de modélisation computationnelle pour comprendre comment le système fonctionne.

### III. Médecine des systèmes et médecine de précision

La médecine des systèmes s'appuie sur la biologie des systèmes pour donner un sens à des observations complexes ou à des ensembles de données expérimentales et cliniques afin d'améliorer notre compréhension des maladies et de leurs traitements, sans mettre de côté le contexte dans lequel elles apparaissent et se développent<sup>483</sup>. C'est une science interdisciplinaire qui promeut une approche intégrative et holistique de l'étude du corps humain et de ses pathologies, et qui s'oppose à la vision réductionniste du paradigme actuel de la médecine humaine<sup>484</sup>. Cette médecine associe les cliniciens aux biologistes, biostatisticiens, informaticiens, mathématiciens et à la modélisation informatique afin de développer des méthodes pour tirer parti des données disponibles ou nouvellement acquises. L'espoir est d'améliorer la prise en charge des patients et de faire de la médecine personnalisée une

réalité accessible à tous. Mais c'est un challenge majeur : comment valider ces approches et les rendre pertinentes pour le patient et son médecin. Pour répondre à ce défi et pour exploiter les données issues des nouvelles sciences et technologies omiques, le développement et l'utilisation de l'intelligence artificielle, du *machine learning* et en particulier du *deep learning* sont indispensables.

Le *deep learning*, sous-catégorie du *machine learning*, lui-même un exemple d'intelligence artificielle, s'inspire du fonctionnement du cerveau humain : les algorithmes traitent l'information reçue de façon similaire à ce que feraient nos réseaux de neurones en réponse aux signaux nerveux qui leur sont destinés. En fonction du type et de la fréquence des messages reçus, certains réseaux de neurones vont se développer quantitativement et qualitativement alors que d'autres vont régresser (aussi appelé *deep neural network*). Ce sont des algorithmes mathématiques qui s'améliorent par l'expérience (**Figure 55**). Ils nécessitent la plupart du temps un grand volume de données et donc une large puissance de traitement pour constituer et exploiter un réseau de neurones.

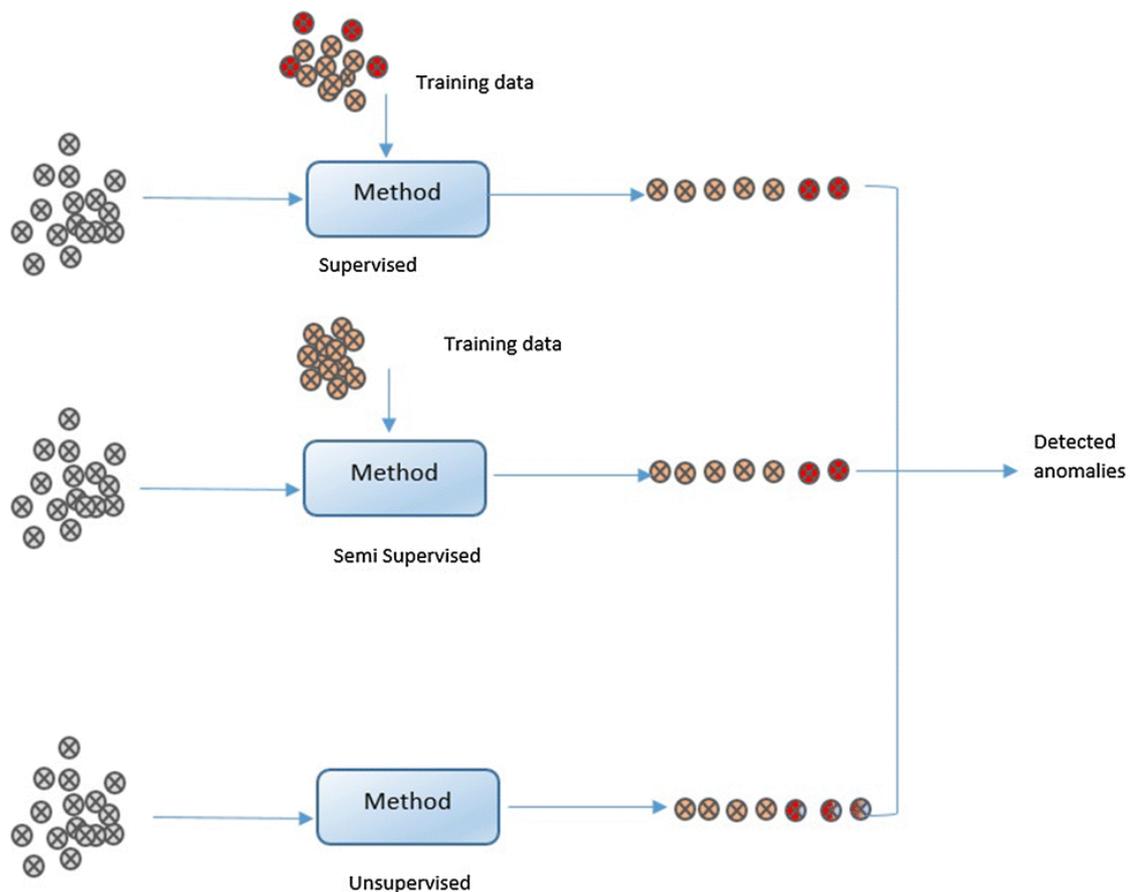


Figure 55. Méthodes de détection des anomalies basées sur un ensemble de données. Il existe trois grandes catégories de techniques de détection d'anomalies : la détection d'anomalies non supervisée, supervisée et semi-supervisée. Comme il n'est pas facile de disposer d'un ensemble de données étiquetées pour la détection d'anomalies, la plupart des approches sont basées sur des méthodes d'apprentissage non supervisé ou semi-supervisé dont l'objectif est de trouver les comportements anormaux. Les méthodes basées sur l'apprentissage supervisé utilisent des données entièrement étiquetées ; la détection d'anomalies semi-supervisée utilise un ensemble de données sans anomalie pour la formation et détecte l'anomalie si elle s'écarte de l'ensemble de données formé, tandis que la méthode de détection non supervisée utilise des informations intrinsèques pour détecter les valeurs anormales sur la base de l'écart par rapport à la majorité des données.<sup>485</sup>

Le champ de la médecine profitant le plus de ce changement de paradigme est l'oncologie : Traditionnellement, c'est une discipline qui repose sur les probabilités observées chez un ensemble de patients ayant le même type de cancer. Mais c'est également une discipline qui a bénéficié très tôt des avancées de la médecine de précision avec le développement de thérapies ciblées en fonction des caractéristiques moléculaire de la tumeur du patient. Le *deep learning* permet aujourd'hui d'identifier des sous-types de cancers grâce aux données d'expression des gènes et à l'activité de facteurs de transcription clés<sup>486</sup> ; ou bien d'identifier des sous-groupes de survie en intégrant des données multi-omiques telles que le transcriptome (séquençage des mRNA et des miRNA) des patients et le métabolome disponible sur la base de données *The Cancer Genome Atlas*<sup>487</sup>.

Le *deep learning* participe également à l'identification de nouveaux biomarqueurs, que ce soient des molécules uniques ou des profils moléculaires (**Figure 56**). De manière intéressante, grâce à ces outils, l'analyse mathématique de l'imagerie médicale peut permettre d'identifier de nouveaux biomarqueurs<sup>488,489</sup>.

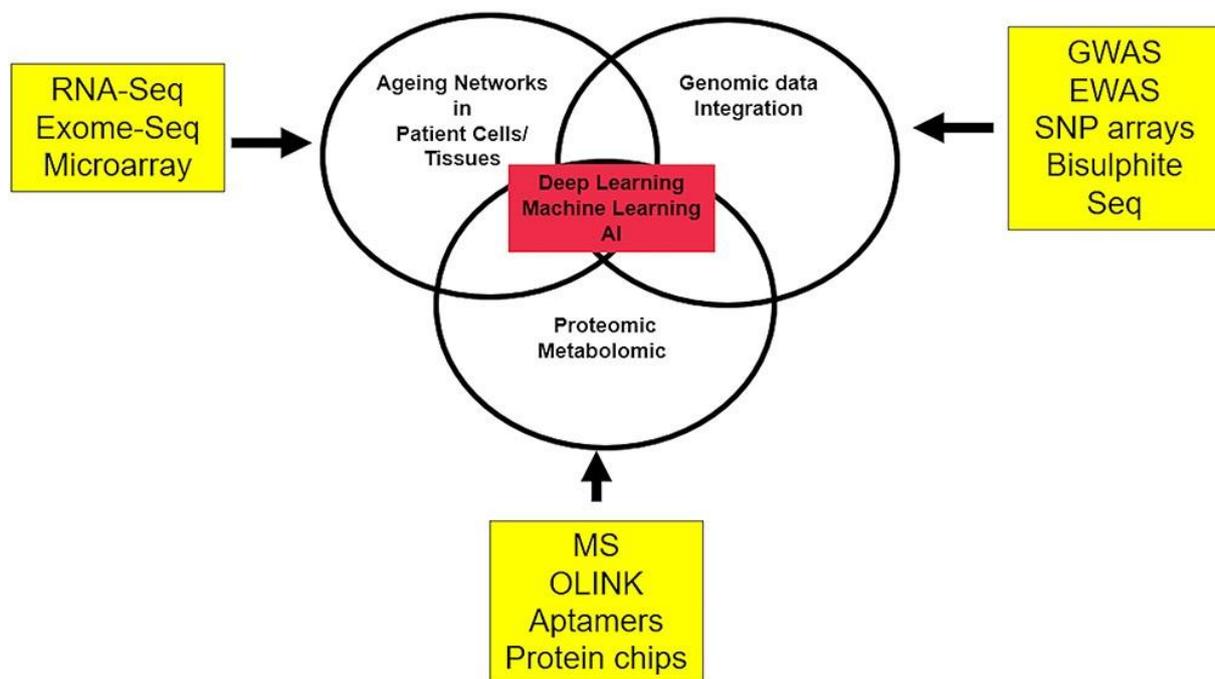


Figure 56. Deep learning pour l'identification de profils de biomarqueurs. Seq : Séquençage, GWAS: Genome wide association studies.<sup>484</sup>

La médecine prédictive, préventive, personnalisée et participative (médecine 4P) est l'un des moteurs cliniques et sociétaux de la médecine des systèmes<sup>490</sup>. Il existe une différence de concept entre la médecine de précision et la médecine personnalisée : la médecine personnalisée fait référence à une approche des patients qui tient compte de leur patrimoine génétique, mais aussi de leurs préférences,

de leurs croyances, de leurs comportements, de leurs connaissances et de leur contexte social, tandis que la médecine de précision décrit un modèle de prestation de soins de santé qui s'appuie fortement sur les données, l'analyse et l'information<sup>491</sup>.

Ainsi, la médecine personnalisée est une approche globale de la médecine dans laquelle le diagnostic, le pronostic et la prédiction de la réponse au traitement prennent en compte des facteurs propres à l'individu, plutôt que les données issues de populations de patient. Elle a le potentiel de rationaliser et d'améliorer la qualité de la prise en charge des patients en s'éloignant du paradigme « taille unique/patient moyen ». L'accent est mis sur l'individualité du patient en tenant compte de son génotype, de son phénotype, de son épigénétique, de son mode de vie, de son exposition à l'environnement, etc. (Figure 57).

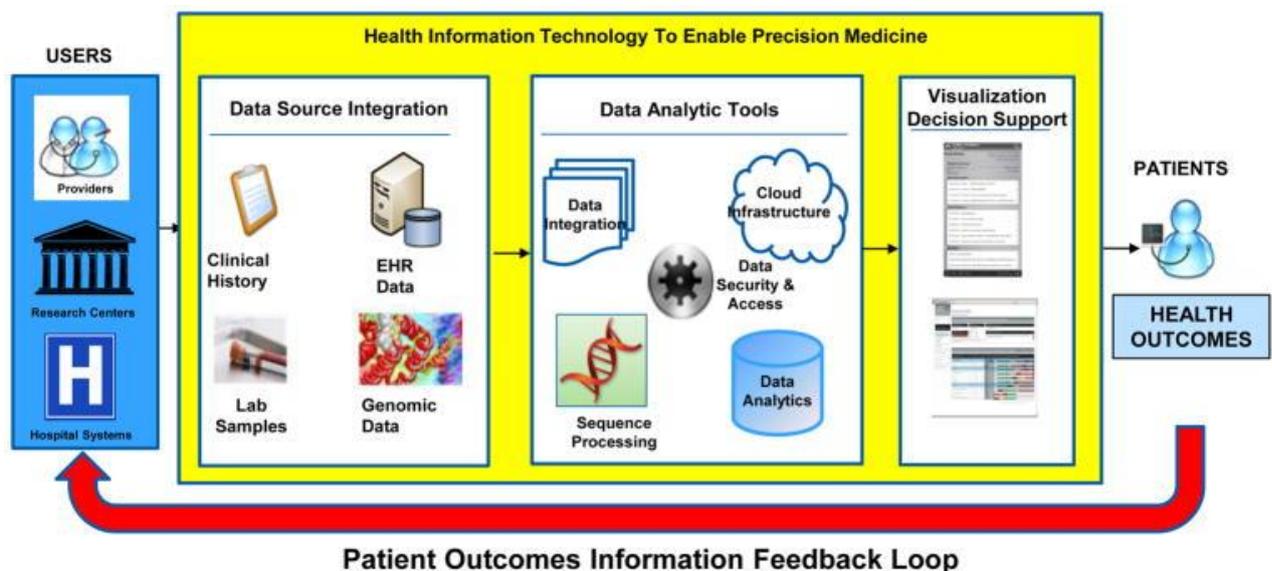


Figure 57. Le système de santé basé sur les sciences omiques.

Seule la génomique est représentée sur ce schéma. Plus récemment, d'autres sciences omiques viennent enrichir ce processus.<sup>491</sup>

Les prémisses de la médecine de précision sont déjà en place dans des disciplines comme la pharmacogénétique ou l'oncologie, comme vu précédemment. Mais le champ d'application de la médecine de précision est bien plus large et le défi sera d'intégrer la complexité du patient et de son environnement grâce aux bases de données médicales, à l'utilisation en routine de technologies de pointe et à l'intelligence artificielle, pour proposer aux équipes médicales des informations et des outils cliniquement exploitables (Figure 58).



Figure 58. Représentation de l'interaction entre le défi de la complexité et l'exigence de la précision de la médecine moderne. D'une part, la médecine est de plus en plus complexe dans ses dimensions cliniques, biologiques, technologiques, environnementales et organisationnelles des soins. D'autre part, l'exigence croissante de précision dans la prise en charge peut être incarnée par les quatre piliers : prédiction, prévention, personnalisation et participation active du patient à sa prise en charge.<sup>492</sup>

Un autre aspect clé de la médecine 4P est l'aspect prédictif et préventif dont le but est d'établir la probabilité qu'a un patient de développer une pathologie et ainsi de mettre en place des stratégies de prévention ou de diagnostic et de traitement précoce afin d'éviter la progression de la maladie.

Par exemple, un algorithme de *deep learning* a été appliqué pour prédire de multiples facteurs de risque cardiovasculaire, notamment l'âge, le sexe, le tabagisme et la pression artérielle systolique, à partir d'images de fond d'œil, permettant d'améliorer la stratification du risque cardiovasculaire<sup>493</sup>. Testé sur 11 835 participants d'une biobanque (UK Biobank), le système a démontré sa capacité à prédire l'apparition d'événements cardiovasculaires majeurs dans les cinq ans.

Au-delà des applications pour le diagnostic précoce d'une maladie, le *deep learning* a montré qu'il pouvait améliorer les soins palliatifs en évaluant les patients admis en hospitalisation et en identifiant ceux qui risquent de mourir dans les 3 à 12 mois à venir. Ainsi, une approche proactive pourrait être

adoptée pour s'adresser aux patients qui pourraient bénéficier d'une consultation en soins palliatifs et les impliquer ainsi que leurs familles dans une prise de décision éclairée<sup>494</sup>.

Au total, l'avènement des sciences omiques et de la médecine de précision ont ouvert de nouvelles perspectives dans la compréhension des pathologies à l'échelle individuelle, notamment grâce à l'analyse d'une grande quantité de données dans la population. Ces données permettent une meilleure appréhension notamment de la variabilité inter et intrafamiliale dans les maladies génétiques et d'explorer l'héritabilité manquante des maladies complexes. Le phénotypage clinique précis des patients occupe une place cruciale puisqu'il permet d'orienter les investigations et d'interpréter les données obtenues. Grâce aux sciences omiques, il devient possible d'identifier des sous-groupes de patients présentant des caractéristiques communes, facilitant ainsi un diagnostic plus précoce et une prise en charge adaptée.

## IV. Les sciences omiques

### 1. Étude des acides nucléiques

#### a) Méthodes d'étude

L'étude d'un grand nombre d'acides nucléiques repose sur deux technologies : le séquençage à haut débit (*Next Generation Sequencing*, NGS) et les puces (*microarrays*).

Le principe du NGS repose sur le séquençage en parallèle de millions de fragments d'acides nucléiques. Les deux technologies les plus utilisées, Illumina et Ion Torrent, séquent un acide nucléique amplifié de manière clonale en séquençant le brin complémentaire en cours de synthèse (*sequencing by synthesis*, SBS). Si les technologies de séquençage de 2<sup>ème</sup> génération sont largement répandues dans les laboratoires de recherche et de diagnostic (le séquençage Sanger étant le séquençage de 1<sup>ère</sup> génération), les technologies de 3<sup>ème</sup> voire 4<sup>ème</sup> génération se développent : il s'agit de technologies permettant le séquençage de longs fragments (approches *long read* vs. *short read* pour la 2<sup>ème</sup> génération) – utilisables sur ADN natif – donnant ainsi accès à de nouvelles régions du génome et à la compréhension de remaniements complexes, et facilitant l'assemblage de nouveaux génomes.

De nombreuses applications du NGS sont possibles : séquençage du génome humain (ADN nucléaire ou mitochondrial) ou de régions cibles du génome humain (panels ou exome) ; séquençage de l'ADN

tumoral ; séquençage de génomes viral ou bactérien (reséquençage ou *de novo*) ; séquençage des ARN, ARN messagers et/ou ARN non codants tels que les miRNA ; identification des régions méthylées de l'ADN par traitement de l'ADN par bisulfite du sodium puis séquençage ; identification des modifications des protéines associées à l'ADN (méthylation ou acétylation des histones) et des points de contact de l'ADN (organisation en 3 dimensions de l'ADN) par figement des interactions puis séquençage des régions impliquées. Ces technologies peuvent donc être utilisées de manière ciblée ou non-ciblée.

Les puces à ADN permettent l'identification et la quantification de cibles grâce à des sondes réparties et fixées de façon covalente à la surface d'une biopuce. Ces puces peuvent être utilisées pour l'identification de grands remaniements (duplications ou délétions) de l'ensemble du génome ou pour l'analyse d'un profil d'expression avec des sondes complémentaires des ARN à détecter. De nombreuses puces sont disponibles dans le commerce ou peuvent être fabriquées sur mesure. Il s'agit donc d'une approche ciblée, discrète, mais pouvant balayer l'ensemble du génome ou du transcriptome d'un organisme de manière reproductible.

#### *b) Génomique et maladies lysosomales*

Le génome est l'ensemble de l'ADN d'un organisme. L'approche génomique consiste en l'analyse du génome dans son ensemble (*whole genome sequencing*, WGS). Dans le cadre du diagnostic de maladies génétiques, cette approche peut être réduite à l'analyse des exons de l'ensemble des gènes (*whole exome sequencing*, WES), réduisant ainsi la quantité de données produites à la partie la mieux connue et la plus facilement exploitable du génome.

Dans le cadre des maladies héréditaires du métabolisme, et en particulier des maladies lysosomales, les approches génomiques sont principalement utilisées dans un cadre diagnostique<sup>495,496</sup>. Dans les cas extrêmes, ces maladies restent non identifiées pendant la vie du patient et les diagnostics sont posés *post mortem*<sup>497</sup>. Parce qu'elles sont rares, les maladies lysosomales sont difficiles à reconnaître en tant que telles et sont donc sous-diagnostiquées. Lorsque des investigations métaboliques et génétiques approfondies sont réalisées chez des patients atteints de troubles héréditaires inconnus, les maladies lysosomales peuvent représenter jusqu'à 1,5 % des diagnostics<sup>498</sup>.

L'analyse de l'exome et du génome par séquençage de nouvelle génération peut également révéler de nouveaux variants impliqués dans ces troubles ainsi qu'élargir le spectre phénotypique et permettre d'établir des corrélations génotype-phénotype<sup>499-503</sup>. Étant donné que les phénotypes des maladies

lysosomales peuvent varier considérablement et que les présentations cliniques peuvent se chevaucher avec d'autres maladies héréditaires du métabolisme voire d'autres maladies génétiques et entités phénotypiques, l'approche globale que constitue la génomique est un outil de diagnostic inestimable<sup>504-507</sup>. Les présentations atypiques dans ces maladies rares, voire très rares, sont courantes, altérant encore plus la reconnaissance clinique et rendant les approches génétiques globales encore plus pertinentes<sup>508-510</sup>. Une autre caractéristique des maladies lysosomales, comme d'autres MHM, est la possibilité d'apparitions tardives de la pathologie, se manifestant parfois à un âge avancé avec souvent des présentations cliniques et biologiques non caractéristiques. La génomique permet une approche sans *a priori* de ces patients<sup>511-515</sup>. Ces stratégies ont ainsi mis fin à l'errance diagnostique pour un certain nombre de patients mais sans réduire le délai diagnostique global<sup>516-518</sup>.

Plus récemment, le WES comme analyse diagnostique de première intention est venu bousculer les stratégies diagnostiques habituelles consistant en la réalisation de différentes analyses de manière séquentielle qui sont alors utilisées comme analyses de confirmation (investigations biochimiques, enzymatiques ou d'imagerie)<sup>519</sup>. Malgré un prix encore élevé et une complexité technique, ce nouveau paradigme semble être une approche efficace en termes de coût et de temps par rapport aux approches séquentielles biochimiques et moléculaires conventionnelles<sup>520</sup>. Un exemple extrême de cette nouvelle stratégie est l'utilisation de l'exome rapide dans le cadre clinique aigu – comme par exemple dans le cadre néonatal –, contribuant à plusieurs domaines de la médecine de précision : diagnostic, pronostic et résultat, gestion et thérapie, et utilisation des ressources<sup>521</sup>.

Cependant, les techniques d'exome ou de génome entier ne dispensent pas les cliniciens d'un phénotypage minutieux car c'est celui-ci qui déterminera la meilleure stratégie diagnostique pour chaque patient et aidera à la recherche d'informations moléculaires cliniquement pertinentes parmi la grande quantité de données générées<sup>503</sup>. Il est également important de garder en tête les limites actuelles du WGS et du WES, notamment une faible profondeur de lecture par rapport au séquençage du panel, ce qui peut entraver l'établissement d'un diagnostic moléculaire, renforçant ainsi l'importance d'établir une stratégie diagnostique personnalisée<sup>522</sup>.

Parce qu'il s'agit encore de processus relativement nouveaux, coûteux et chronophages, le WES et le WGS sont encore utilisés dans les cas où d'autres approches diagnostiques ont échoué. Il n'est donc pas surprenant qu'elles puissent conduire à la découverte de nouveaux gènes impliqués dans la pathologie humaine et de nouvelles maladies lysosomales<sup>523,524</sup>.

Le séquençage de l'exome entier représente l'essentiel des approches génomiques à l'ère des omiques, le séquençage génomique entier étant encore peu utilisé dans un cadre diagnostique. En effet, le WGS

représente un coût encore conséquent et produit un grand nombre de variants non codants – variants introniques profonds et extra-géniques – et de variants dans des régions régulatrices qui sont actuellement difficilement interprétables.

Les bases de données génomiques en population générale sont également un outil important. Les données de séquençage de l'exome ou du génome entier à grande échelle disponibles publiquement (ExAC et GnomAD<sup>525,526</sup>, 1000 Genomes Project<sup>527</sup>, etc.) permettent l'analyse de variants rares dans les gènes impliqués dans les MHM en déterminant la prévalence dans différentes populations et aident aux classifications desdits variants, avec un réel impact clinique<sup>528</sup>.

Au-delà de l'utilisation diagnostique, les approches génomiques peuvent être utilisées dans le cadre de l'étude de la physiopathologie des maladies lysosomales. Par exemple, dans la maladie de Gaucher de type 1, les études d'association pangénomique (*genome wide association studies*, GWAS) peuvent révéler des modificateurs génétiques chez des patients présentant le même variant homozygote mais des phénotypes variables<sup>529</sup>. L'analyse du génome combinée à une annotation rigoureuse du phénotype est également une approche efficace pour identifier les gènes modificateurs impliqués dans l'apparition de cancers chez certains patients atteints de maladie de Gaucher<sup>530</sup>.

À l'inverse, chez les patients atteints de maladies complexes, le WES peut mettre en évidence une charge excessive de variants dans des gènes associés à des maladies héréditaires, favorisant la compréhension de la physiopathologie. Dans la maladie de Parkinson, dans laquelle les variantes de la maladie de Gaucher sont des facteurs de risque bien connus, il semble y avoir un nombre plus important de variants dans d'autres gènes de maladies lysosomales par rapport aux personnes non atteintes, ce qui sous-tend l'importance de la fonction lysosomale dans la pathogenèse de la maladie de Parkinson<sup>531</sup>.

Dans la maladie de Fabry en particulier, celle-ci étant une maladie avec un spectre phénotypique large et une expression clinique parfois peu spécifique, la génomique – en particulier l'approche par séquençage d'exome – permet de diagnostiquer des patients avec atteintes rénales ou cardiaques par exemple sans étiologie retrouvée<sup>532</sup>. Ceci souligne l'importance de la sensibilisation des cliniciens à la maladie de Fabry, du dépistage par dosage de l'activité enzymatique et par étude moléculaire des patients à risque et l'intégration du gène *GLA* dans les panels de gènes pour différentes indications (atteintes rénales, cardiaques, neurologiques, vasculaires...).

### c) *Épigénomique et maladies lysosomales*

Les modifications chimiques de l'ADN, des histones et autres molécules interagissant avec l'ADN (protéines non-histones, ARN nucléaire), ainsi que l'organisation en trois dimensions de l'ADN, constituent l'épigénétique<sup>533,534</sup>. Ces modifications affectent l'expression des gènes sans modifier la séquence de l'ADN. Ces marques épigénétiques peuvent être transitoires ou transmises d'une cellule à ses cellules filles, voire héritées d'un parent. Elles peuvent être programmées, physiologiques (organisation de la chromatine dans l'espace, gènes soumis à empreinte, inactivation de l'X) ou dues à des expositions environnementales.

Ainsi, une analyse épigénomique fournira des données différentes en fonction du temps et du tissu analysé. L'interprétation des épi-variants reste difficile, notamment du fait de manque de bases de données disponibles et la variabilité inter- et intra-individuelle de l'épigénome.

Les approches épigénomiques peuvent être utilisées dans le cadre de maladies avec une physiopathologie encore mal comprise. Par exemple, dans la maladie de Niemann-Pick de type C (NPC) qui perturbe le trafic du cholestérol, le mécanisme qui entraîne la dysfonction neuronale n'est pas élucidé. L'analyse du métabolisme des acides aminés et de la méthylation de l'ADN chez un modèle de souris NPC a permis de mettre en évidence une perturbation du métabolisme d'acides aminés clés dans la méthylation de l'ADN et de la régulation épigénétique de l'expression génique avec une hypométhylation globale de l'ADN dans le cervelet – organe impliqué dans la pathologie – de souris pré-symptomatiques ou pauci-symptomatiques<sup>535</sup>.

### d) *Transcriptomique et maladies lysosomales*

Les approches transcriptomiques sont essentielles pour comprendre les mécanismes physiopathologiques. Les principales stratégies utilisées sont le RNA-seq et les puces dans les tissus de modèles murins de maladies lysosomales, dans les organoïdes dérivés de cellules souches pluripotentes induites humaines (*induced pluripotent stem cells*, iPSC), dans les fibroblastes des patients, et plus rarement dans le sang périphérique.

Le cerveau est le tissu le plus couramment étudié dans les maladies lysosomales. En effet, de nombreuses ML présentent une atteinte du système nerveux central, comme, par exemple, les mucopolysaccharidoses, la maladie de Niemann-Pick de type C, ou les céréoïdes lipofuscinoses<sup>536-540</sup>.

Des études transcriptomiques dans le cerveau de modèles murins dévoilent les voies neurologiques altérées dans ces maladies, telles que l'altération du guidage des axones, l'homéostasie calcique,

l'interaction ligand-récepteur synaptique, le rythme circadien et la signalisation Wnt, mettant en évidence les mécanismes interconnectés entraînant un dysfonctionnement puis la mort cellulaire<sup>536</sup>. La neuroinflammation et la dérégulation de l'immunité font partie des principales voies impliquées, avec, par exemple, une régulation à la hausse des gènes de l'immunité innée avec un changement de leur expression dépendant de l'âge et un enrichissement des gènes liés à la réponse immunitaire et à l'inflammation<sup>536,538,539</sup>. La dérégulation de l'expression des gènes varie entre les régions du cerveau, indique une spécialisation régionale des gènes<sup>537</sup>.

Dans un modèle organoïde cérébral humain de céréoïde lipofuscine neuronale de type 3 (CLN3), les études de réseau de régulation génique basées sur les interactions des gènes au niveau transcriptionnel permettent la détection de gènes « hubs ». Ces gènes centraux pourraient être des gènes cibles, dont la modulation permettrait d'inverser le phénotype pathologique et de normaliser le réseau de régulation génique. Et ce bien que ces gènes ne soient pas nécessairement responsables de l'apparition et de la progression de la maladie<sup>540</sup>.

Les études transcriptomiques montrent également que les LD présentent des voies altérées partagées avec des troubles neurodégénératifs complexes fréquents (maladie d'Alzheimer, maladie de Parkinson), avec une évolution générale commune de la neurodégénérescence, quelle qu'en soit la cause primaire, associées à un chevauchement entre les processus impliqués dans ces maladies et ceux impliqués dans le vieillissement<sup>536,541</sup>.

L'activation des voies moléculaires liées à l'inflammation se retrouve également dans d'autres tissus comme dans le foie de souris atteintes de la maladie de Farber – une sphingolipidose – et dans des modèles murins de la maladie de Gaucher, avec des schémas d'expression altérés des gènes impliqués dans l'activation des macrophages et des gènes de réponse immunitaire<sup>542,543</sup>.

Les approches transcriptomiques peuvent également être pertinentes dans la recherche de nouveaux biomarqueurs, en combinaison avec des approches protéomiques. Par exemple, dans un modèle murin de la maladie de Gaucher et des fibroblastes de patients de Gaucher, une molécule auparavant non reconnue, CHI3L1 (chitinase-3-like protein 1), une glycoprotéine sécrétée et marqueur pro-inflammatoire, a été identifiée<sup>544</sup>. Les concentrations de CHI3L1 étaient significativement augmentées et ont été réduites après traitement.

Des études transcriptomiques dans plusieurs tissus et dans le sang périphérique peuvent également révéler des marqueurs plasmatiques potentiels ou spécifiques pour les atteintes neurologiques associées aux maladies lysosomales<sup>538</sup>. Cette approche peut fournir un outil accessible pour évaluer l'effet des thérapies sur la progression de la maladie, ainsi qu'un outil efficace et peu invasif pour les

études sur les biomarqueurs et les mécanismes de la maladie, non seulement pour les ML, mais aussi potentiellement pour d'autres maladies neurologiques<sup>545</sup>.

La normalisation des voies transcriptionnelles dévoile le potentiel de traitements tels qu'un inhibiteur d'histone désacétylase dans le foie de souris NPC ou une thérapie génique *in vivo* dans le cerveau et le sang de souris MPSIIIA, ce qui en fait un potentiel marqueur précoce de la réponse au traitement<sup>546-548</sup>.

L'étude du transcriptome peut également offrir de nouvelles cibles thérapeutiques en amont de multiples voies dérégulées dans des maladies sans thérapie disponible et peut expliquer le mécanisme d'action des traitements dans des maladies plus fréquentes<sup>549,550</sup>.

Les analyses du transcriptome sont le plus souvent focalisées sur les ARN codants (ARN messagers ou ARNm). Cependant, l'exploration des petits ARN non codants et notamment des microARN (miARN) peut offrir de nouveaux biomarqueurs. Dans la maladie de Pompe, les miARN surexprimés dans les formes infantiles de la maladie sont exprimés à des niveaux plus élevés et de manière précoce chez les patients présentant une évolution plus sévère de la maladie et sont modulés par l'enzymothérapie substitutive<sup>551,552</sup>.

Dans la maladie de Fabry, l'approche transcriptomique a permis d'explorer la relation entre l'accumulation de Gb3 et la vasculopathie dans des cellules endothéliales vasculaires, d'explorer l'effet de régulateurs du protéasome dans des fibroblastes de patients, d'explorer le mécanisme d'action de l'enzymothérapie substitutive dans des leucocytes de patients ainsi que son effet dans des lignées podocytaires immortalisées<sup>550,553-555</sup>.

## 2. Étude des protéines et des métabolites

### a) Protéomique et maladies lysosomales

Les protéines constituent environ la moitié de la masse sèche de la cellule et sont extrêmement diverses. En quantifiant l'ensemble des protéines exprimées dans un compartiment cellulaire, dans une cellule ou dans un groupe de cellules (d'un organe ou d'un organisme), on obtient le protéome. Celui-ci reflète la physiologie, la structure, les capacités métaboliques et de nombreux autres aspects du mode de vie de l'organelle, de la cellule, du tissu ou de l'organisme. L'analyse par spectrométrie de masse de différentes lignées cellulaires humaines met en évidence une similarité importante du protéome entre les différentes lignées, notamment pour les protéines impliquées dans les fonctions

cellulaires de base<sup>556</sup>. La variabilité provient principalement des protéines impliquées dans les voies métaboliques, qui présentent une forte redondance.

Les techniques protéomiques génèrent une grande quantité de données et il est possible de visualiser la composition des protéomes selon l'abondance et la fonction des protéines identifiées et quantifiées<sup>557</sup>. On retrouve une prédominance du métabolisme et de la machinerie cellulaire permettant la production de protéines (**Figure 59**).

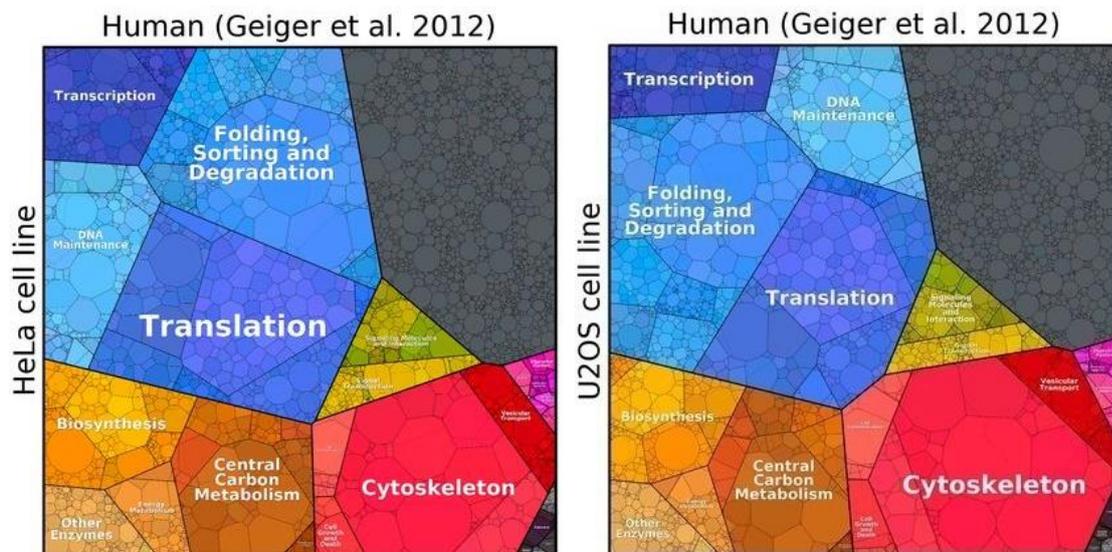


Figure 59. Protéomes de cellules HeLa et U2OS humaines. Les protéines sont classées par catégories fonctionnelles et représentées en fonction de leur abondance.<sup>556,557</sup>

Dans le cadre de l'étude de la physiologie lysosomale et de la physiopathologie des maladies lysosomales, le terme « protéomique » recouvre plusieurs approches et concepts tels que :

- la protéomique ciblée et non ciblée,
- la protéomique « totale » (protéome de la cellule ou du tissu étudié) et la protéomique lysosomale, avec l'étude des protéines marquées au mannose-6-phosphate<sup>558,559</sup>,
- la phosphoprotéomique avec l'utilisation d'une puce avec anticorps phosphospécifiques ou l'analyse du sécrétome<sup>560,561</sup>.

Les approches protéomiques peuvent également aider à comparer les stratégies d'enrichissement des lysosomes<sup>562</sup>. Différentes techniques sont employées : les techniques les plus utilisées sont les méthodes de spectrométrie de masse couplées à la chromatographie, mais l'électrophorèse bidimensionnelle, les tests d'électrochimiluminescence ou l'immunodosage quantitatif sont

également mis en œuvre<sup>288,563,564</sup>. Les plateformes commerciales existantes permettent une approche de routine des études protéomiques<sup>565</sup>. Une grande partie des études protéomiques sont réalisées sur des échantillons de patients, allant des cellules mononucléaires du sang périphérique aux iPSC obtenues à partir de fibroblastes de patients et aux échantillons d'urine et de plasma<sup>288,561,563,566-574</sup>.

Un exemple de pathologie étudiée grâce à la protéomique est la maladie de Niemann-Pick de type C. Le déficit en protéine NPC1 ou NPC2, protéines intégrales de la membrane lysosomale, entraîne des défauts dans le trafic de cholestérol intracellulaire et l'accumulation de cholestérols non estérifiés dans les endosomes/lysosomes tardifs<sup>575</sup>. Les caractéristiques cliniques comprennent l'hépatosplénomégalie et la neurodégénérescence progressive, avec une variabilité importante dans l'âge d'apparition de la maladie, les symptômes et la durée de vie. Malgré une littérature abondante, la physiopathologie du NPC n'est toujours pas entièrement comprise.

La protéomique quantitative des fibroblastes humains porteurs du variant pathogène le plus fréquent dans le gène *NPC1* par rapport à des fibroblastes témoins a mis en évidence des protéines exprimées de manière différentielle impliquées dans divers processus cellulaires tels que la maturation des protéines, le métabolisme énergétique, le métabolisme des espèces réactives de l'oxygène, l'activité antioxydante, le métabolisme des stéroïdes, la localisation des lipides et l'apoptose<sup>576</sup>.

Des modèles murins de NPC ont été largement utilisés pour étudier la physiopathologie du NPC. Des études protéomiques sur les hépatocytes de souris NPC ont montré des modifications dans les niveaux d'expression des protéines impliquées dans les lésions hépatiques, le métabolisme des lipides et l'inflammation<sup>577</sup>. Parmi les protéines différentiellement exprimées, un certain nombre sont des protéines lysosomales, mais d'autres sont des protéines mitochondriales, suggérant un dysfonctionnement mitochondrial dans les cellules hépatiques NPC.

Les méthodes de spectrométrie de masse pour quantifier les protéines lysosomales dans le cerveau de modèles souris fournissent une preuve de principe pour les approches protéomiques pour identifier les altérations secondaires des activités lysosomales, qui pourraient représenter des réponses cellulaires compensatoires<sup>559</sup>. La protéomique quantitative dans le cortex cérébral, le cervelet et le corps calleux des souris NPC permet de mieux comprendre la physiopathologie de la neurodégénérescence, de l'hypomyélinisation et de la progression de la maladie cérébelleuse<sup>564,565,578</sup>.

La maladie de Niemann-Pick C manque actuellement de traitement efficace, mais un certain nombre de molécules ont montré un potentiel thérapeutique. Cependant leur mécanisme d'action n'est pas entièrement connu. Des études protéomiques de cellules fibroblastes NPC dérivées de patients montrent que différentes cyclodextrines peuvent être utilisées pour réduire l'accumulation de

cholestérol lysosomal, avec différents niveaux de cytotoxicité<sup>579,580</sup>. Les traitements à la cyclodextrine (CD) ont modifié le schéma d'expression des protéines cellulaires, suggérant que la modulation médiée par la CD de l'accumulation de cholestérol intracellulaire peut impliquer une multitude de voies cellulaires telles que le transport intracellulaire des vésicules, le métabolisme des lipides et la croissance cellulaire. Les protéines régulées à la hausse comprenaient la protéine de membrane lysosomale LAMP-1<sup>581</sup>. Les cyclodextrines faciliteraient le trafic de cholestérol au niveau des endosomes tardifs/compartiments lysosomaux, réduisant l'accumulation du cholestérol dans les fibroblastes NPC.

Subramanian *et al.* ont montré grâce à une approche protéomique que le traitement des fibroblastes NPC avec le Vorinostat, un inhibiteur de l'histone désacétylase, restaure l'homéostasie du cholestérol en améliorant les voies favorisant le repliement, la stabilisation et le trafic de la protéine mutée NPC1, et a un impact sur les métabolismes énergétique et lipidique<sup>582</sup>.

Ces études protéomiques fournissent des points de départ pour de futures investigations plus ciblées afin de mieux comprendre les cascades pathologiques dans le NPC et d'identifier des biomarqueurs potentiels et des cibles thérapeutiques.

Dans d'autres maladies lysosomales, les approches protéomiques fournissent des données inestimables. Elles fournissent des clés pour mieux comprendre les phénotypes associés aux maladies lysosomales tels que le syndrome de Fanconi dans la cystinose ou la vulnérabilité précoce de la moelle épinière dans la céréoïde lipofuscinose de type 1 (CLN1)<sup>583,584</sup>. Elles mettent en lumière des atteintes d'organes qui étaient jusqu'alors inconnues, comme le phénotype musculo-squelettique dans la maladie de Niemann-Pick de type A/B<sup>585</sup>. Elles participent à l'identification des bases moléculaires du rôle de la dysfonction lysosomale dans la neurodégénérescence dans les maladies lysosomales et les maladies neurodégénératives plus fréquentes<sup>586-588</sup>. Elles contribuent à la compréhension de la physiopathologie et à la recherche de cibles thérapeutiques candidates dans d'autres ML telles que les céréoïdes lipofuscinoses, la sialidose, les mucopolysaccharidoses et les maladies de Gaucher, Krabbe et Pompe<sup>589-596</sup>. Elles aident à identifier de nouveaux biomarqueurs pour le diagnostic, le pronostic, et l'évolution de la maladie, que ce soient des biomarqueurs spécifiques d'une ML ou des biomarqueurs d'atteintes d'organes<sup>288,570,597-600</sup>. Elles participent à l'évaluation de nouveaux systèmes d'administration de médicaments pour améliorer l'enzymothérapie substitutive<sup>601</sup>.

Dans la maladie de Fabry, les approches protéomiques ont exploré principalement deux aspects : la physiopathologie et les biomarqueurs. Le profilage protéomique des cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) des patients Fabry a montré un certain nombre de protéines exprimées de

manière différentielle par rapport aux témoins liées au repliement des protéines, à la transduction du signal et à la prolifération cellulaire ainsi que des protéines décrites dans les accidents cardiovasculaires et les traumatismes cérébraux, dans l'inflammation aiguë et chronique, et dans les processus neurodégénératifs, améliorant la compréhension des mécanismes moléculaires sous-jacents à la pathologie<sup>563</sup>. Un autre type de cellule obtenu à partir de patients Fabry convenant aux études de physiopathologie de la maladie est les cellules dérivées de l'urine<sup>569</sup>. Slaats *et al.* ont montré qu'il s'agissait d'un modèle cellulaire *in vivo* adéquat, car les analyses protéomiques quantitatives ont révélé une dérégulation des protéines endosomales et lysosomales, et un schéma protéomique ressemblant aux données du modèle de podocyte humain décrit précédemment de la maladie de Fabry<sup>602</sup>. Les profils protéomiques plasmatiques peuvent également révéler des caractéristiques moléculaires de la pathogenèse de la maladie de Fabry et de la réponse à l'ERT, tels que l'inflammation, le stress oxydatif et l'activation du complément<sup>566</sup>. Les profils protéomiques plasmatiques et urinaires sont également utilisés pour dévoiler de nouveaux biomarqueurs. Tebani *et al.* ont identifié des marqueurs plasmatiques non corrélés avec le LysoGb3 susceptibles d'être utilisés dans le diagnostic et le suivi du traitement de la maladie de Fabry<sup>288</sup>. La protéomique urinaire a montré que les voies biologiques principalement affectées par la maladie de Fabry sont liées à la réponse immunitaire, à l'inflammation et au métabolisme énergétique<sup>573</sup>. Les protéines régulées à la hausse comprenaient la prostaglandine H2 d-isomérase, et certaines de ces protéines ont été restaurées à des niveaux normaux pendant l'ERT et pourraient donc être des marqueurs utiles pour surveiller la réponse de l'ERT<sup>573,574</sup>.

Une autre approche de l'identification des biomarqueurs est la détermination des profils de biomarqueurs<sup>573</sup>. Les profils peuvent distinguer les patients Fabry présentant peu de manifestations cliniques de témoins, y compris de patients atteints d'autres maladies rénales, métaboliques et cardiovasculaires, peuvent identifier des marqueurs de la progression précoce de la maladie et sont spécifiques au sexe<sup>567,570</sup>.

Un certain nombre d'approches protéomiques ont exploré la physiopathologie cardiaque et rénale ainsi que les biomarqueurs afin de surveiller la progression de la maladie spécifique à un organe<sup>603</sup>. Des études protéomiques de cardiomyocytes différenciés à partir de lignées de cellules souches humaines révèlent la régulation à la baisse des protéines impliquées dans la libération des vésicules exocytaires, l'altération du flux autophagique et du renouvellement des protéines, entraînant une augmentation des espèces réactives de l'oxygène et de l'apoptose, et la physiopathologie de l'accumulation massive de vacuoles<sup>561,604</sup>. Ils ont également fourni des cibles potentielles pour les thérapies adjuvantes : Chien Y. *et al.* ont constaté que l'arachidonate 12/15-lipoxygénase (Alox12/15)

était le marqueur le plus régulé à la hausse dans les cardiomyocytes dérivés d'iPSC de patients Fabry<sup>568</sup>. Les patients à un stade avancé de fibrose myocardique sont insensibles à l'ERT. Les auteurs ont montré que l'administration d'un inhibiteur pharmacologique Alox12/15 combiné à l' $\alpha$ -galactosidase réduisait efficacement l'hypertrophie des cardiomyocytes et supprimait la régulation à la hausse des biomarqueurs fibrotiques à la phase tardive de la cardiomyopathie de Fabry. La confrontation des résultats protéomiques avec des paramètres cliniques, tels que la fibrose myocardique identifiée par IRM cardiaque, permet l'identification de nouveaux biomarqueurs pour la détection précoce de l'atteinte d'organes<sup>572</sup>. De même, les études protéomiques peuvent aider à identifier de nouvelles voies de signalisation candidates potentielles et des cibles pour la thérapie adjuvante à l'enzymothérapie substitutive afin de réduire la morbidité de la maladie rénale chronique dans la maladie de Fabry<sup>560</sup>. La protéomique urinaire a identifié de nouveaux biomarqueurs pour le diagnostic et le suivi des maladies rénales chez les patients Fabry pédiatriques présymptomatiques<sup>571</sup>.

Au total, les approches protéomiques fournissent de nouvelles perspectives pour de futures études, peuvent caractériser des modèles nouvellement établis à partir de cellules de patients – un pas vers la médecine personnalisée –, identifier de nouveaux biomarqueurs ou nouvelles cibles thérapeutiques et être utilisées pour surveiller l'évolution de la maladie<sup>563,569,570,573,604</sup>.

Il est à noter que les données protéomiques et donc les conclusions des études dépendent largement des méthodes employées. La préparation des échantillons est une étape cruciale qui déterminera quel type de protéines et de peptides sera détecté. Certaines protéines connues pour être présentes dans certains types cellulaires ou s'accumuler dans certaines maladies peuvent échapper à l'identification dans les conditions standards<sup>605</sup>. La technologie utilisée et l'identification ultérieure des protéines doivent également être prises en compte, et dans le cas de la protéomique réalisée sur des liquides tels que le plasma et l'urine, ou sur des cellules, l'identification de protéines lysosomales ne présume pas de leur distribution.

#### *b) Métabolomique et maladies lysosomales*

Le métabolome est défini comme l'ensemble des métabolites présents dans un système biologique, un fluide, une cellule ou un tissu donné à un moment donné<sup>492,606</sup>. La métabolomique consiste en la caractérisation biochimique et la quantification des métabolites et de leurs fluctuations en réponse à des facteurs internes et environnementaux<sup>607</sup>. Les principales techniques utilisées sont la spectrométrie de masse (*mass spectrometry*, MS) couplée à la chromatographie en phase liquide ou gazeuse et la résonance magnétique nucléaire (*nuclear magnetic resonance*, NMR)<sup>608</sup>. Les approches

non ciblées permettent d'identifier l'ensemble des molécules de bas poids moléculaire dans un échantillon biologique et de réaliser un profilage métabolique sans a priori. Son objectif est d'obtenir le plus de données possible de manière impartiale pour générer des hypothèses pouvant être utilisées pour une analyse ciblée ultérieure. Du fait du grand nombre de métabolites présents dans les fluides biologiques et de leur hétérogénéité, l'identification de toutes les molécules peut être un défi. Pour y répondre, des référentiels spectraux précis et larges bases de données sont nécessaires<sup>609</sup>. Les approches ciblées permettent quant à elles une meilleure précision et sensibilité. Elles sont déjà utilisées dans les laboratoires de biologie médicale<sup>610</sup>. Ainsi ces deux approches apportent des informations différentes et sont complémentaires (**Figure 60**).

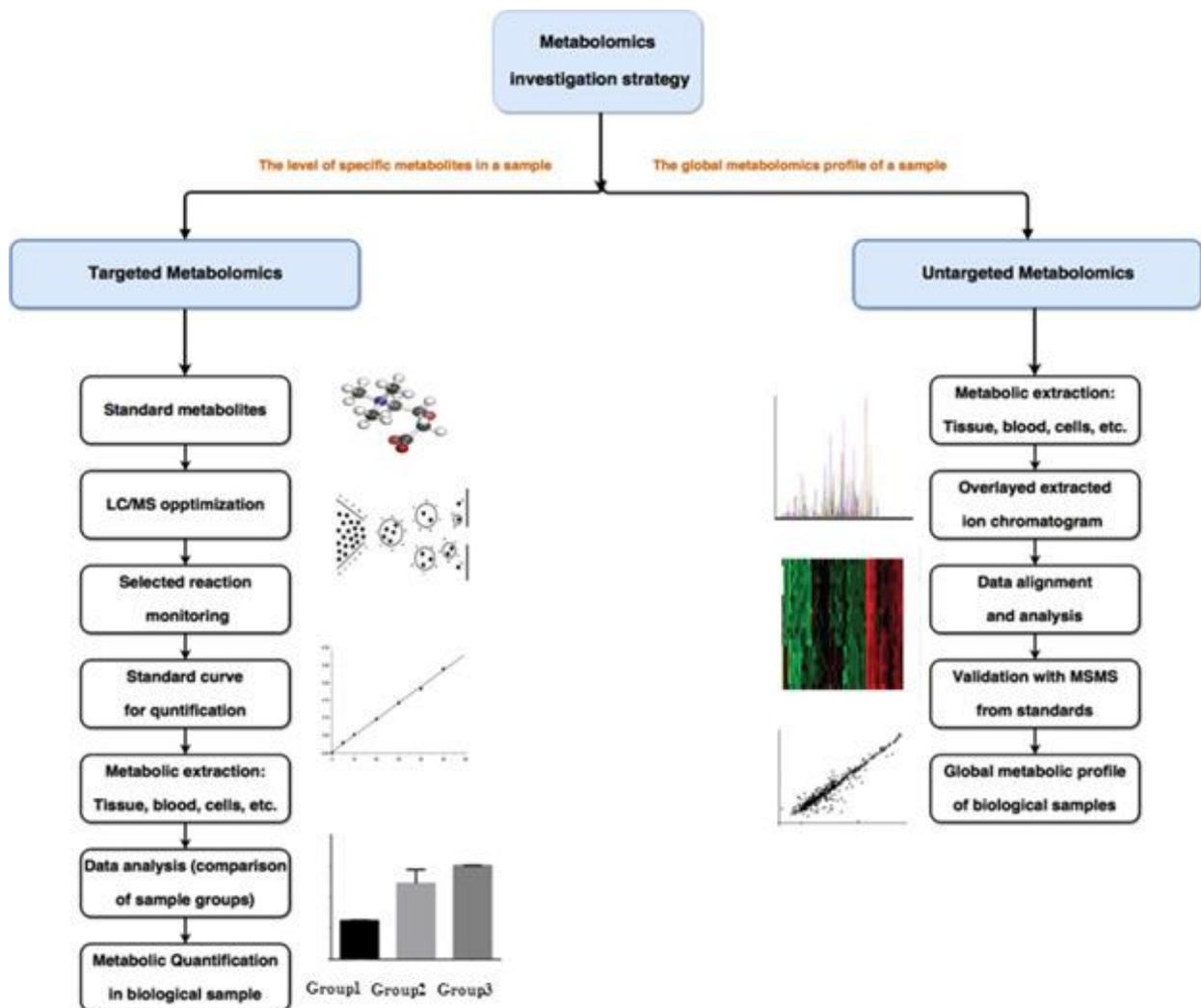


Figure 60. Workflow ciblé et non ciblé pour la métabolomique basée sur la LC-MS.<sup>611</sup>

La métabolomique a été utilisée dans diverses maladies lysosomales pour l'exploration de la physiopathologie, la recherche de biomarqueurs ainsi que l'étude de l'effet des traitements.

Par exemple, dans la maladie de Pompe, l'approche métabolomique a été utilisée pour explorer le phénotype musculo-squelettique de la pathologie. Dans des myocytes différenciés à partir d'iPSC de fibroblastes de patients avec une forme infantile de maladie de Pompe, l'analyse métabolomique par spectrométrie de masse (MALDI-TOF) a mis en évidence une détérioration du métabolisme énergétique cellulaire qui serait principalement due à une dysfonction mitochondriale<sup>612</sup>. Des cardiomyocytes différenciés à partir d'iPSC de fibroblastes de patients avec une forme tardive de maladie de Pompe présentaient un schéma métabolique unique caractérisé par des concentrations plus élevées d'acides aminés, de lactate et de glutathion oxydé, ainsi qu'une teneur plus faible en carnitine, par rapport aux cellules contrôles<sup>613</sup>. L'élévation des concentrations en acides aminés a également été mise en évidence dans le muscle squelettique de souris KO pour le gène *GAA* comparé à du muscle de souris sauvages par CE-MS<sup>614</sup>. Cette élévation est liée à l'augmentation de l'activité du protéasome chez les souris Pompe. L'analyse métabolomique des cardiomyocytes a révélé que le stress oxydatif et le stress mitochondrial peuvent être à l'origine de la pathologie cardiaque associée à la maladie de Pompe. Comme le montre le profilage métabolomique, une majoration du stress oxydatif a également été détectée dans les cellules musculaires squelettiques et les cardiomyocytes des souris atteintes de la maladie de Pompe *in vivo*. Une dérégulation des mécanismes de défense contre le stress oxydant, tels que NRF-2, un facteur de transcription impliqué dans la réponse au stress oxydant, a également été constatée dans les cellules musculaires squelettiques et les cardiomyocytes des souris atteintes. En outre, il a été montré que l'ajout d'un activateur de NRF-2 pouvait atténuer la production de glutathion oxydé et réduire les niveaux d'espèces réactives de l'oxygène dans les cardiomyocytes. L'ensemble de ces résultats suggère que le stress oxydatif pourrait être une cible thérapeutique potentielle dans la maladie de Pompe.

Des explorations métabolomiques ont été réalisées dans d'autres maladies lysosomales telles que la maladie de Niemann-Pick de type C, les céroïdes lipofuscinoses neuronales, les mucopolysaccharidoses, la maladie de Farber, les gangliosidoses, etc<sup>542,615-619</sup>.

Dans la maladie de Fabry, l'approche métabolomique par spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide dans l'urine et le plasma de patients Fabry a montré l'accumulation d'analogues du lyso-Gb3<sup>620-624</sup>. Les concentrations de ces analogues sont plus élevées chez les hommes que chez les femmes Fabry, avec une diminution chez les patients traités par ERT. La mise en évidence de ces analogues pourrait permettre de mieux identifier l'origine des glycosphingolipides qui s'accumulent dans la maladie de Fabry.

Une étude métabolomique ciblée par spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide a permis de discriminer les patients atteints de Fabry de contrôles grâce à une signature métabolique de 13 métabolites plasmatiques, dont la méthionine sulfoxyde, deux lysophosphatidylcholines et dix glycérophospholipides, soulignant le rôle important des glycérophospholipides et du stress oxydatif dans la pathophysiologie de la maladie de Fabry<sup>625</sup>. Un modèle prédictif utilisant les 13 métabolites a montré une aire sous la courbe de 0,992 pour diagnostiquer les patients atteints de Fabry. La signature métabolique était corrélée avec les concentrations plasmatiques de lyso-Gb3 et l'activité enzymatique de l' $\alpha$ -GAL.

Une étude glycosphingolipidomique par LC-MS/MS sur le plasma et l'urine d'une cohorte de patients Fabry, regroupés en femmes symptomatiques, femmes asymptomatiques, hommes et un contrôle sain, a également démontré un remodelage métabolique dans la maladie de Fabry<sup>411</sup>. L'analyse multivariée a montré que dix isoformes à longue chaîne de céramides dihexosides dans l'urine sont élevés chez les patients Fabry et ont été capables de discriminer les femmes atteintes mieux que le Gb3 et le lyso-Gb3, en particulier le groupe de femmes asymptomatiques (qui sont les plus difficiles à diagnostiquer) des femmes témoins.

Ces approches métabolomiques mettent en évidence le remodelage métabolique survenant dans la maladie de Fabry, ainsi que le potentiel diagnostique des approches basées sur les sciences omiques.

### 3. Multi-omique

Afin d'étudier les processus biologiques complexes, l'approche intégrative par la combinaison des données multi-omiques est impérative. Les données multi-omiques englobent des informations provenant de différentes couches moléculaires telles que le génome, l'épigénome, le transcriptome, le protéome et le métabolome (**Figure 61**). Ces données, générées grâce aux techniques à haut débit, sont essentielles pour comprendre la biologie et les maladies de manière holistique. En effet, l'intégration de ces données multi-omiques permet d'analyser les relations entre les différentes biomolécules et leurs fonctions, et ce de manière dynamique. Cette approche aide à combler le fossé entre les informations génétiques, le génotype, et les caractéristiques observables, le phénotype<sup>626</sup>.

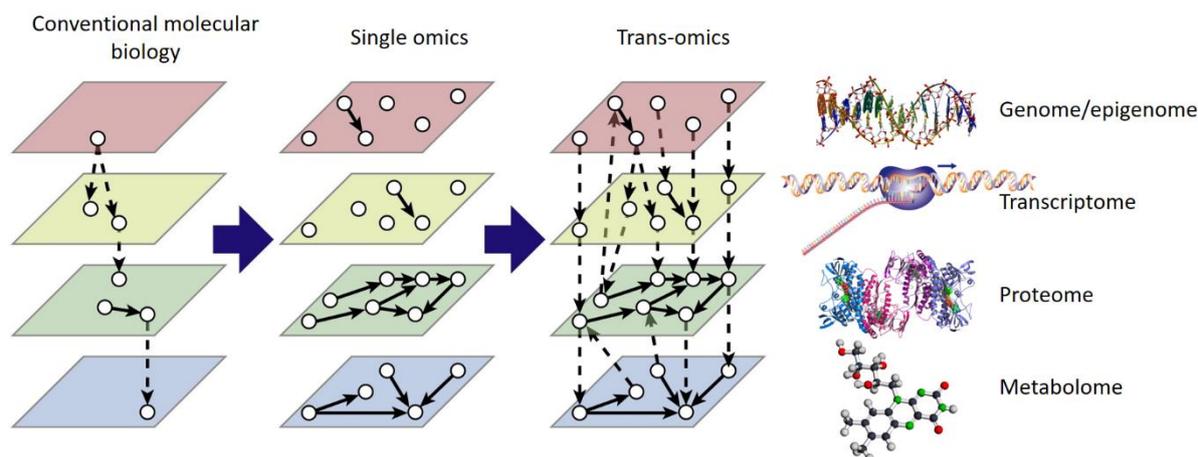


Figure 61. Intégration des données omiques.

L'analyse trans-omique permet d'avoir une vue d'ensemble de milliers de facteurs et de modèles qui conduisent à des résultats globaux qui seraient autrement indétectables par des biomarqueurs uniques. Adapté de <sup>627</sup>.

Les données multi-omiques sont générées à partir de diverses plateformes, ce qui présente des défis en termes de stockage et de formats. Des outils et méthodes ont été développés pour intégrer et analyser ces données, contribuant ainsi à la compréhension des mécanismes biologiques et des maladies en répondant à différentes questions biologiques : pour effectuer le sous-typage et la classification des maladies sur la base de profils multi-omiques, pour prédire les biomarqueurs pour diverses applications, y compris les diagnostics et les gènes moteurs des maladies, ou pour dériver des informations sur la biologie des maladies.

Les approches intégratives ont le potentiel d'améliorer les prédictions et la précision des phénotypes de maladies, ce qui pourrait conduire à de meilleurs traitements et préventions<sup>628</sup>. Il existe des bases de données publiques qui fournissent des ensembles de données multi-omiques telles que The Cancer Genome Atlas (TCGA) (<https://cancergenome-nih-gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/>) ou Omics Discovery Index (<https://www.omicsdi.org>).

L'information clinique pourrait également être intégrée pour une compréhension plus approfondie. Cependant, des défis subsistent, tels que l'hétérogénéité des données, leur grande taille nécessitant des calculs intensifs et le manque de hiérarchisation des outils disponibles.

Malgré ces obstacles, l'approche intégrative des données multi-omiques est considérée comme une stratégie puissante pour décrypter les mécanismes cellulaires. Des méthodes uniformes et conviviales sont nécessaires pour visualiser, analyser et interpréter efficacement ces données. L'intelligence artificielle peut jouer un rôle crucial afin de répondre à ces défis, mais nécessite des ensembles de

données suffisamment grands et de haute qualité pour l'entraînement des modèles, ainsi qu'une expertise pour la conception et l'optimisation des architectures de réseaux de neurones<sup>629</sup>.

#### 4. *Genome-scale metabolic modeling* ou modélisation métabolique à l'échelle du génome

Les progrès récents des technologies omiques ont généré une multitude de données biologiques. L'intégration de ces données dans des modèles mathématiques est essentielle pour exploiter pleinement leur potentiel. Les modèles métaboliques à l'échelle du génome (*genome-scale metabolic modeling*, GEM) constituent un cadre solide pour l'étude de systèmes biologiques complexes<sup>630</sup>.

Comprendre la relation complexe entre le génome et le métabolisme nécessite une modélisation mathématique du métabolisme. La construction de modèles décrivant les processus métaboliques cellulaires découle du besoin de saisir et d'interpréter des systèmes au-delà des capacités de l'intuition humaine, notamment lorsque les processus deviennent de plus en plus complexes. Ces modèles servent de passerelle pour naviguer dans la complexité et améliorer notre compréhension de la dynamique du système. De plus, l'intégration de données expérimentales est facilitée par la présence d'un modèle, permettant ainsi la génération et la vérification de nouvelles hypothèses concernant les mécanismes sous-jacents régissant les systèmes biologiques. Un modèle permet également de prédire les effets de diverses perturbations, telles que les variations génétiques ou les modifications de l'environnement, sur la fonction métabolique<sup>630</sup>.

La base de la construction des modèles réside dans la compréhension des substrats et des produits impliqués, ainsi que celle des réactions qu'une cellule peut exécuter. La réversibilité des réactions, le compartiment cellulaire dans lequel les réactions se produisent et les coefficients stœchiométriques des métabolites sont des considérations cruciales. De plus, l'établissement des relations gène-protéine-réaction (GPR) reliant les gènes aux réactions par le biais d'enzymes est essentiel pour la précision du modèle<sup>630</sup>.

Les informations génomiques guident le codage des réactions métaboliques, conduisant à la formation de peptides et de protéines participant à ces réactions. Chaque étape du processus biochimique correspond à une réaction biochimique qui peut être décrite mathématiquement par un vecteur. L'agencement collectif de ces vecteurs aboutit à une matrice stœchiométrique, avec les métabolites représentés en tant que lignes et les réactions en tant que colonnes. Au sein de la matrice, les réactions

sont codées avec des coefficients stœchiométriques, où les substrats portent des coefficients négatifs et les produits des coefficients positifs<sup>630</sup>.

La transition du génome à un modèle métabolique implique l'annotation des gènes et la mise en correspondance avec une base de données de réactions biochimiques. Ce processus implique la traduction des gènes en protéines et en enzymes, déterminant ainsi les réactions et les réseaux à encoder. Les associations gène-réaction sont souvent multidirectionnelles, plusieurs gènes pouvant coder pour la même réaction et *vice versa*. De nombreuses méthodes existent pour construire des modèles à l'échelle du génome. L'objectif principal de ces modèles est de déduire les flux ou les taux de réaction caractérisant le métabolisme de l'organisme dans des conditions spécifiques<sup>630</sup>. Deux approches distinctes de reconstruction peuvent être adoptées :

- Reconstruction *Bottom-Up* : cette approche commence par un génome annoté, aboutissant à un modèle provisoire de réactions annotées. La curation manuelle ultérieure aboutit à un modèle fonctionnel.
- Reconstruction *Top-Down* : en utilisant un modèle universel complet englobant toutes les réactions métaboliques connues, les réactions encodées dans le génome sont identifiées. Le génome est utilisé pour affiner le modèle universel, aboutissant à un modèle adapté qui correspond aux réactions codées dans le génome.

Le problème des lacunes, ou des réactions manquantes conduisant à des composants déconnectés du réseau, est inhérent à la construction de modèles métaboliques à l'échelle du génome<sup>631</sup>. Ces lacunes résultent d'une connaissance incomplète des réactions ou de réactions spontanées. Le comblement des lacunes est essentiel tant pour les reconstructions *bottom-up* que *top-down*. Dans une reconstruction descendante ou *top-down*, le modèle initial est complet. Ainsi on soustrait les réactions qui ne sont pas encodées par le génome à condition que le modèle reste le moins lacunaire possible. Des modèles alternatifs peuvent découler des efforts de comblement des lacunes.

Les modèles à l'échelle du génome peuvent intégrer différentes couches de données omiques. En considérant l'expression génique (données transcriptomiques) ou les abondances protéiques (données protéomiques) comme des indicateurs de l'activité des réactions, des contraintes peuvent être imposées sur le modèle pour le mettre en accord avec les données expérimentales. La modélisation à l'échelle du génome trouve de larges applications en biologie et en médecine. Elle aide à prédire les cibles médicamenteuses, à étudier les fonctions métaboliques, à analyser les changements métaboliques dans les processus pathogènes et à identifier des perturbations spécifiques à apporter pour corriger un processus pathologique<sup>632</sup> (**Figure 62**). L'intégration des données omiques avec les

GEM peut conduire à de nouvelles découvertes et faire progresser notre compréhension des mécanismes moléculaires des pathologies et en santé humaine.

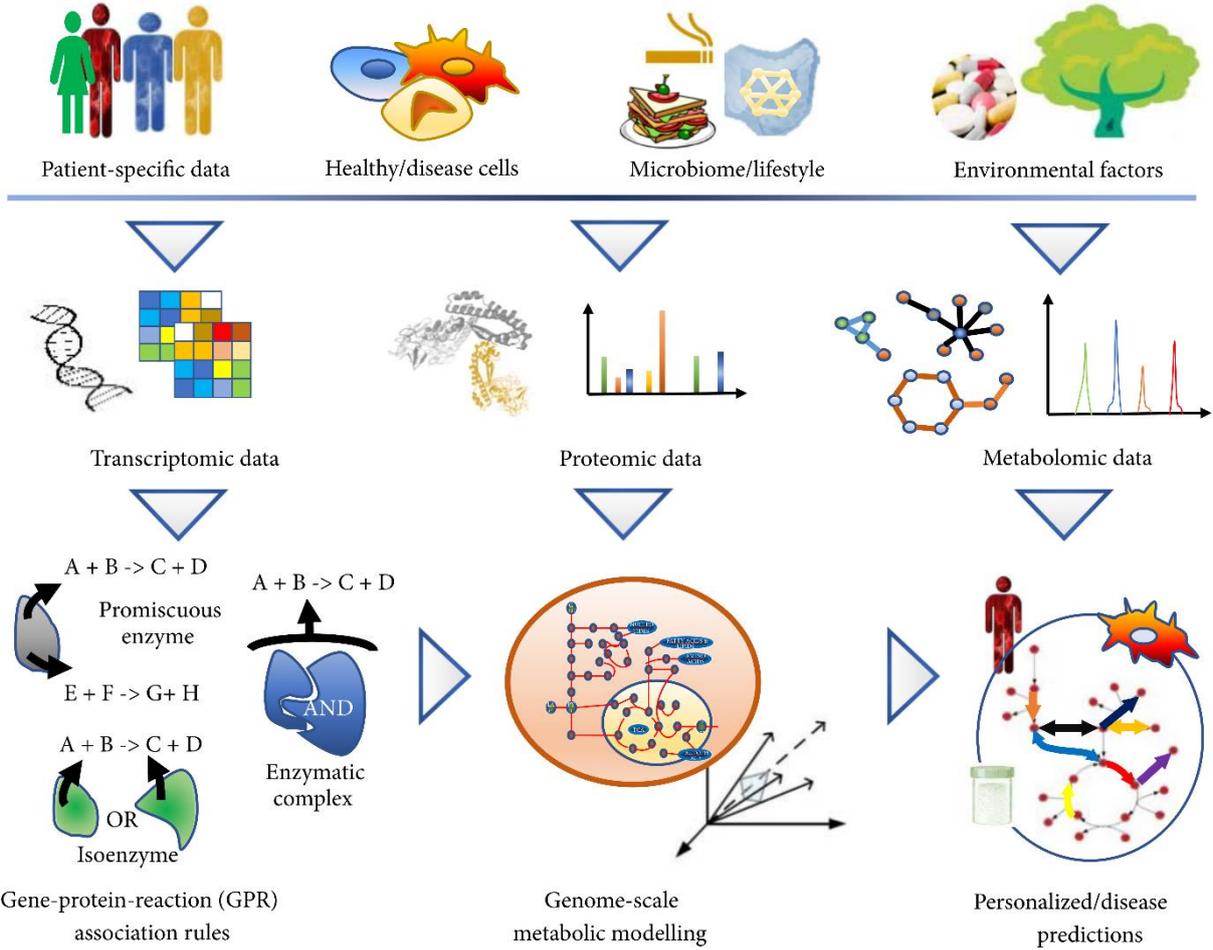


Figure 62. L'intégration de différents types de données omiques peut être utilisée pour déduire les distributions de flux métaboliques intracellulaires en fonction des tissus et des conditions.<sup>633</sup>

## CHAPITRE VI : Techniques omiques utilisées dans le cadre de cette thèse

### I. Technique de dosage ciblée de protéines par technologie multiplex (MSD)

La technologie développée par Meso Scale Discovery (MSD) permet la détection et la quantification de molécules dans les échantillons biologiques. Cette technologie combine l'électrochimiluminescence (ECL) qui se caractérise par une grande sensibilité et la technologie MULTI-ARRAY de MSD, offrant ainsi un système de détection sensible et spécifique, que ce soit pour le dosage de protéines uniques ou d'un grand nombre d'entre elles (**Figure 63**).

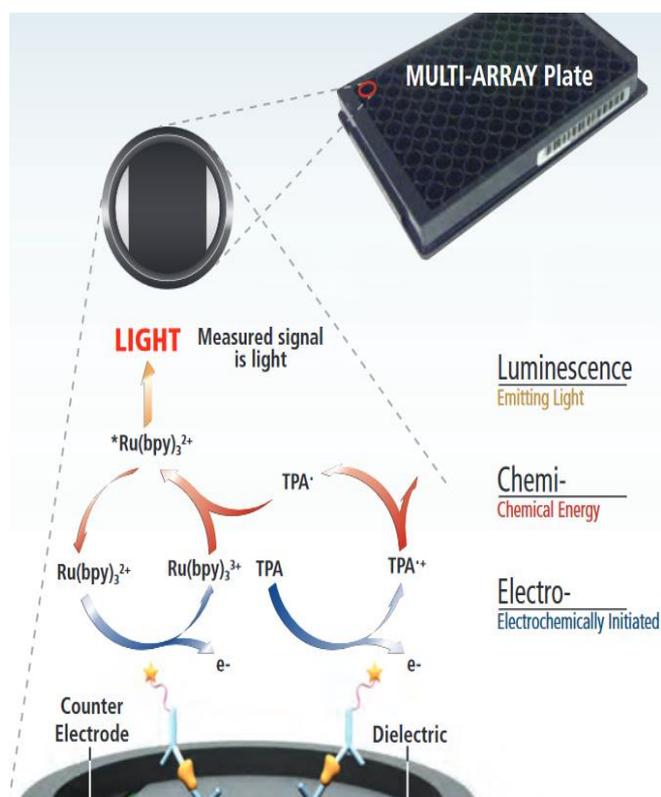


Figure 63. Principe de fonctionnement de la technologie MSD

Les électrodes de carbone à forte capacité de liaison situées au fond des microplaques MULTI-ARRAY et MULTI-SPOT permettent de fixer facilement les réactifs biologiques (capacité de liaison 10 fois supérieure à celle du polystyrène). Les tests MSD utilisent des marqueurs électrochimiluminescents qui sont conjugués à des anticorps de détection. Ces marqueurs, appelés SULFO-TAG, permettent une détection ultra-sensible. L'électricité est appliquée aux électrodes de la plaque par un instrument MSD, ce qui entraîne une émission de lumière par les étiquettes SULFO-TAG. L'intensité lumineuse est ensuite mesurée pour quantifier les analytes dans l'échantillon.

Source : [https://www.mesoscale.com/en/technical\\_resources/our\\_technology/ecl](https://www.mesoscale.com/en/technical_resources/our_technology/ecl)

La technologie MULTI-ARRAY (multi-puce ou multi-essai, **Figure 64**) en plaques permet de multiplexer les analyses en répartissant plusieurs spots recouverts d'anticorps différents dans un même puits.



Figure 64. Puits des plaques MULTI-SPOT

Les plaques MULTI-ARRAY qui offrent des matrices dans le puits pour augmenter le débit et le multiplexage des essais sont disponibles dans les formats 96 et 384 puits, avec jusqu'à 10 spots par puits.

Source : [https://www.mesoscale.com/en/technical\\_resources/our\\_technology/multi-array](https://www.mesoscale.com/en/technical_resources/our_technology/multi-array)

Le principe est proche de celui de la méthode immuno-enzymatique ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) traditionnelle (**Figure 65**) : des anticorps de capture spécifiques, fixés sur des zones cibles dans le puits d'une microplaque avec électrodes, se lient à la protéine d'intérêt<sup>634</sup>.

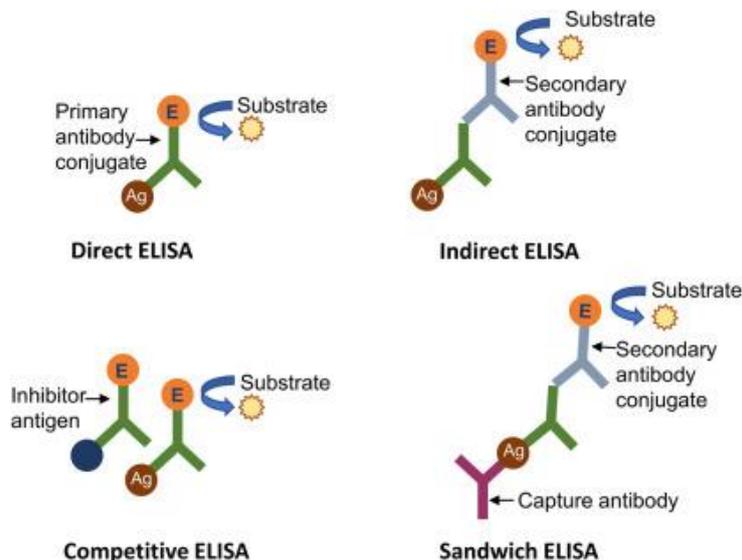


Figure 65. Principe de fonctionnement des anticorps utilisés en ELISA.<sup>635</sup>

La protéine liée est détectée par un second anticorps conjugué à une « étiquette » (ou *tag*) qui émet de la lumière (SULFO-TAG) lorsqu'elle est excitée par l'électricité provenant d'électrodes situées dans la base de la plaque<sup>636</sup>. L'étiquette utilisée est un complexe de ruthénium tris-bipyridine pouvant émettre de la lumière lorsqu'il est excité électrochimiquement<sup>637</sup> (**Figure 66**). Le co-réactif présent dans le « tampon de lecture » amplifie ensuite le signal.

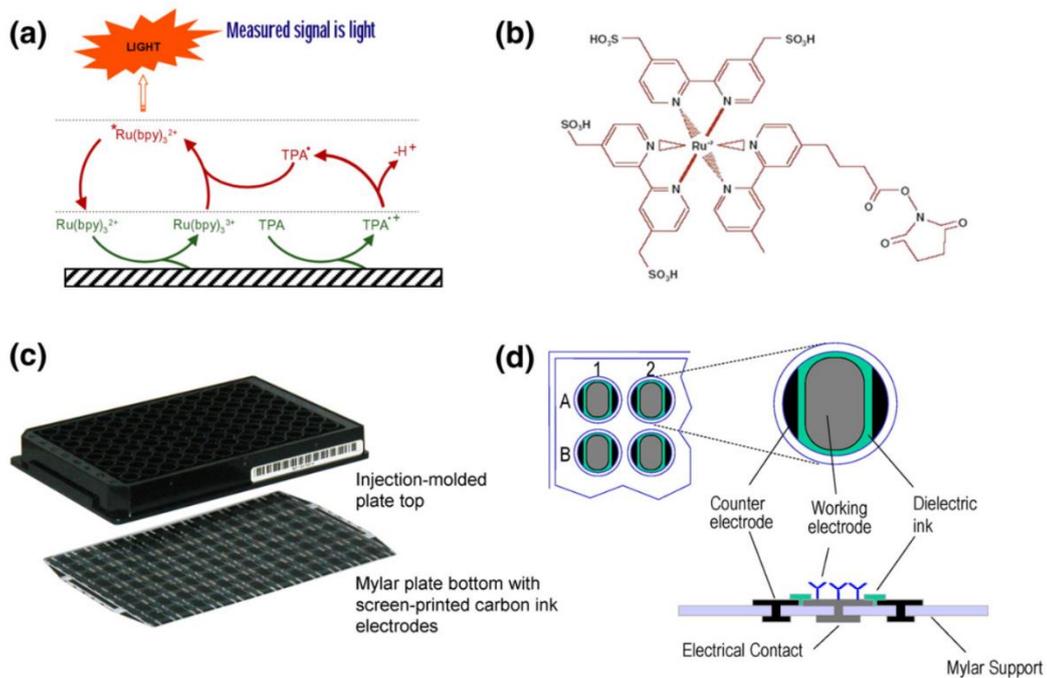


Figure 66. Technologie ECL.

(a) Mécanisme de génération de l'ECL à partir de complexes de ruthénium sur une électrode oxydante en présence de tampons de lecture à base de tripropylamine (TPA). (b) SULFO-TAG NHS-ester, une étiquette ECL qui peut être utilisée pour modifier des anticorps en vue de leur utilisation dans des essais ECL. (c) Vue éclatée d'une plaque d'essai multi-réseaux montrant les deux composants principaux : une plaque supérieure moulée par injection accouplée à une plaque inférieure en Mylar sérigraphié. (d) Vues schématiques d'un puits d'une plaque multi-réseaux montrant la disposition des électrodes sérigraphiées à l'intérieur d'un puits.<sup>637</sup>

L'instrument utilisé pour analyser les plaques est le MESO QuickPlex SQ 120MM avec le logiciel Methodical Mind (**Figure 67**). C'est un instrument fiable, facile d'utilisation, avec un temps de lecture rapide. Deux plaques peuvent être analysées simultanément. Le logiciel DISCOVERY WORKBENCH permet ensuite de retraiter les données et de calculer les concentrations des différents analytes en fonction des gammes d'étalonnage.



Figure 67. MESO QuickPlex SQ 120MM.

Source : [https://www.mesoscale.com/en/products\\_and\\_services/instrumentation](https://www.mesoscale.com/en/products_and_services/instrumentation)

Le protocole est le suivant (**Figure 68**) :

- Nettoyage de la plaque à l'aide d'un tampon spécifique
- Répartition dans les plaques des calibrants et des échantillons dilués à l'aide d'un diluant spécifique en fonction des analytes dosés
- Incubation de la plaque pendant 2 heures
- Nettoyage des plaques pour éliminer les protéines non liées
- Ajout de l'anticorps secondaire, conjugué au SULFO-TAG
- Incubation de la plaque pendant 2 heures
- Lavage de la plaque pour éliminer les anticorps de détection non liés
- Ajout du tampon de lecture et analyse avec l'instrument MSD
- Retraitement des données avec MSD Discovery Workbench

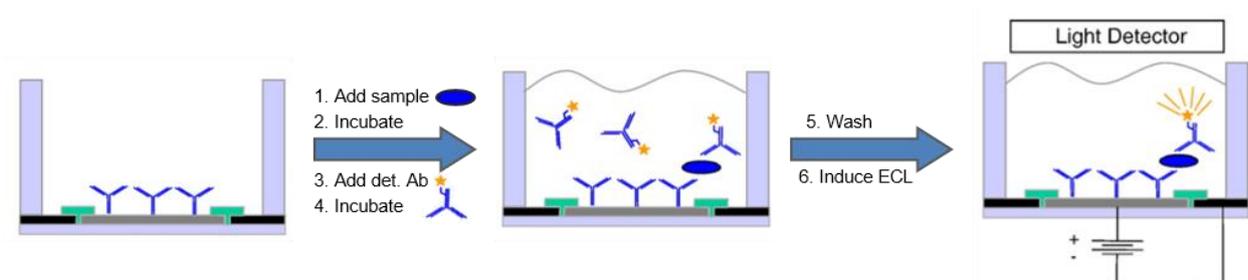


Figure 68. Protocole d'essai ECL. D'après <sup>637</sup>

Par rapport à l'ELISA traditionnel, les puces multiplex avec ECL présentent un certain nombre d'avantages<sup>636,637</sup> :

- Analyses multiplex à haut débit
- Meilleure sensibilité : Les cycles d'excitation multiples peuvent amplifier les signaux pour augmenter l'intensité lumineuse
- Réduction du volume d'échantillon nécessaire (conservation d'échantillons précieux)
- Absence de système de détection enzymatique ou fluorescent évitant les problèmes de décroissance du signal au cours du temps
- Efficacité en termes de temps
- Possibilité de détecter de manière fiable différentes protéines dans une large gamme dynamique de concentrations (pas de dilution nécessaire par exemple)<sup>636</sup>.
- Facilité d'utilisation

## II. Transcriptomique par RNA-seq

L'analyse transcriptomique a été réalisée par séquençage des ARN messagers par NGS, ou RNA-seq.

L'extraction de l'ARN à partir des podocytes est effectuée à l'aide du kit NucleoSpin® RNA/Protein. Le principe est une lyse des cellules par incubation avec une solution contenant de grandes quantités d'ions chaotropiques. Ce tampon de lyse inactive immédiatement la quasi-totalité des enzymes, notamment les RNases, évitant ainsi la dégradation de l'ARN. Le lysat est filtré à travers une membrane de silice. Le tampon de lyse crée des conditions de liaison qui favorisent l'adsorption de l'ARN sur la membrane de silice. L'ADN contaminant, qui est également lié à la membrane de silice, est éliminé par une solution de rDNase qui est directement appliquée sur la membrane de silice pendant la préparation. De simples étapes de lavage avec deux tampons différents éliminent les sels, les métabolites et les composants cellulaires macromoléculaires. L'ARN pur est finalement élué dans des conditions de faible force ionique avec de l'eau exempte de RNase.

Le séquençage de l'ARN est ensuite réalisé sur une plateforme Illumina, par séquençage par synthèse (*sequencing by synthesis*, SBS) haut débit. À partir de l'ARN total, une librairie constituée de fragments spécifiques d'ADNc est préparée. L'ARN ribosomal constitue 80 à 90% de l'ARN total. Ainsi, une étape d'enrichissement de l'ARN messager est nécessaire : elle peut être réalisée par déplétion de l'ARN ribosomal ou par isolement de l'ARNm en séparant les ARN possédant une queue poly(A) des autres

ARN. L'ARNm est ensuite fragmenté (200-300 pb) avant d'être rétro-transcrit en ADNc. Des adaptateurs sont ajoutés par ligation à chaque extrémité des fragments afin qu'ils puissent être fixés sur une lame de verre (*flowcell*) contenant les séquences complémentaires des adaptateurs. Des séquences code-barres sont également ajoutées afin de pouvoir multiplexer les échantillons de plusieurs patients. L'utilisation d'une enzyme excisant l'uracile permet l'obtention d'une librairie brin-spécifique. Les fragments sont ensuite amplifiés par PCR, poolés et chargés dans le séquenceur (**Figure 69**).

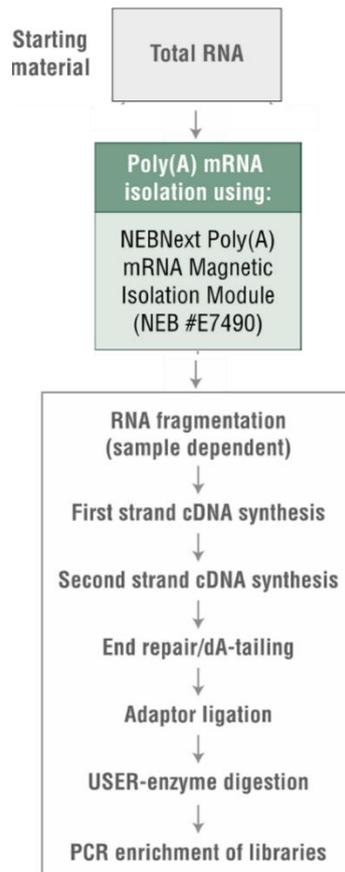


Figure 69. Principales étapes de la préparation de librairie pour le RNA-seq.

Source : <https://international.neb.com/products/e7760-nebnext-ultra-ii-directional-rna-library-prep-kit-for-illumina#Product%20Information>

La première étape consiste en la fixation des fragments d'ADNc sur la *flowcell*. Chaque fragment est dénaturé pour s'hybrider à un oligonucléotide complémentaire de l'adaptateur, fixé sur la *flowcell*. Un nouveau brin complémentaire est synthétisé à partir de chaque fragment hybridé. Le brin matrice non attaché à la *flowcell* est éliminé par lavage, le brin complémentaire nouvellement synthétisé est donc fixé à la *flowcell*. Ce fragment est ensuite amplifié par PCR en pont (*bridge PCR*) : il bascule pour s'hybrider à un autre oligonucléotide de capture situé à proximité pour former un pont (*bridge*). Un nouveau brin complémentaire est synthétisé, puis les deux brins sont dénaturés pour servir de matrice,

et ainsi de suite, jusqu'à la formation de plusieurs milliers de clusters composés de clones d'un même fragment d'ADNc sur la *flowcell* (**Figure 70**).

Ces clusters sont ensuite séquencés grâce à l'utilisation de terminateurs réversibles. Le séquençage et la lecture du nucléotide nouvellement ajouté au brin d'ADN naissant se fait en temps réel grâce à l'incorporation d'un seul nucléotide à la fois. A chaque fois qu'un dNTP est ajouté, il est scanné puis le terminateur est clivé de façon à permettre l'incorporation du nucléotide suivant (**Figure 70**). Le fragment n'est pas séquencé en entier : un certain nombre de bases d'un brin sont séquencées (75 ou 150 paires de bases par exemple), puis le brin complémentaire est synthétisé, le premier brin est éliminé, et le même nombre de bases sont séquencées sur ce second brin. On parle de *pair-end sequencing* (2x75, 2x150, etc.). Cette approche permet de faciliter l'alignement des données sur le génome de référence ainsi que la recherche de remaniements tels que les délétions, insertions ou inversions.

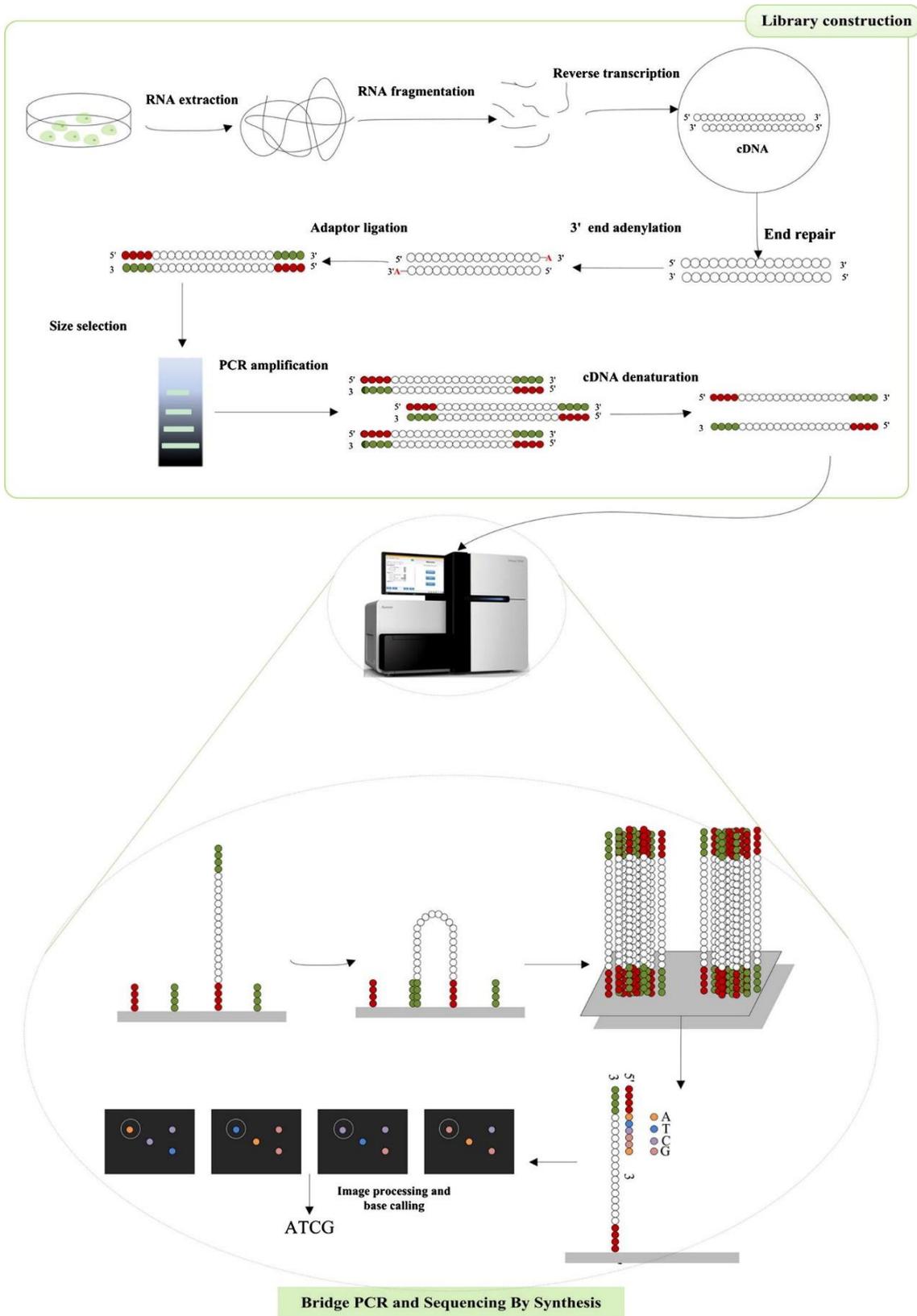


Figure 70. Principe du séquençage par RNA-Seq utilisant la technique SBS avec technologie Illumina. Haut : construction d'une librairie d'ADNc à partir d'ARN total. Bas : fixation à la flowcell, génération des clusters et séquençage. D'après<sup>638</sup>

La profondeur de lecture, c'est-à-dire le nombre de fois qu'est séquencée une même base, dépend de la taille des régions à séquencer et de la capacité du séquenceur utilisé. A titre d'exemple, un génome humain entier de 3 Gb séquencé sur un automate d'une capacité de 120 Gb permet d'obtenir une profondeur de lecture théorique de 40 X. Le séquençage à haut débit permet une approche quantitative avec la possibilité de compter le nombre de copies d'un même fragment ou, pour le RNA-seq, le niveau d'expression d'un gène.

L'analyse des données est effectuée par traitement bioinformatique. L'analyse primaire correspond à l'analyse des données brutes (transformation des images en séquences), à l'attribution de scores de qualité, à l'élimination des séquences des amorces et au démultiplexage des données (attribution des données à chaque patient). L'analyse secondaire consiste en l'alignement des séquences sur un génome de référence. Enfin, l'analyse tertiaire correspond à la détection de variations et à la quantification.

Dans le cadre de cette thèse, la préparation des librairies a été réalisée à l'aide du NEBNext Ultra II Directional RNA Library kit avec sélection des ARN avec queue poly(A) (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). Le séquençage a été réalisé sur une plateforme Illumina NextSeq 500 (Illumina, San Diego, CA, USA) en 2x75pb, générant environ 30M de paires de reads. L'analyse informatique a été réalisée par le pipeline nf-core/RNA-seq v3.1, utilisant les outils STAR v2.6.1d et SALMON v1.4.0 pour l'alignement des séquences<sup>639</sup>.

L'approche RNA-seq présente plusieurs avantages par rapport à l'approche par hybridation sur puces d'expression :

- C'est une approche non ciblée
- La résolution est de l'ordre du nucléotide, pour environ une centaine de nucléotides pour les puces
- La quantification étant corrélée au nombre de séquences lues dans une même région, la sensibilité est meilleure, sans limite inférieure ou supérieure de quantification
- Les quantités d'ARN initiales nécessaires sont bien moindres

### III. Métabolomique ciblée par kit Biocrates

La spectrométrie de masse regroupe un ensemble de techniques d'analyse permettant la mesure de molécules après leur ionisation et en fonction de leur rapport masse sur charge ( $m/z$ )<sup>640</sup>. Le principe de la mesure par spectrométrie de masse repose sur la possibilité pour un flux d'ions d'être dévié par un champ électrique et/ou magnétique, les trajectoires étant proportionnelles à la masse et à la charge de chacun des ions (rapport masse/charge ( $m/z$ )). La spectrométrie de masse est largement utilisée en métabolomique car en plus de sa sensibilité supérieure à celle de la RMN, elle offre la possibilité de couplage à un système chromatographique permettant la séparation préalable des molécules et ainsi d'augmenter la résolution des ions détectés.

Actuellement, la spectrométrie de masse couplée à la chromatographie en phase liquide (LC-MS) est la technique la plus utilisée pour analyser le métabolome du fait des nombreux types de colonnes existant et permettant de couvrir une large gamme de métabolites et de concentrations.

Dans le cadre de cette thèse, un spectromètre de masse en tandem (MS/MS) triple quadripôle couplé à la chromatographie liquide à haute pression a été utilisé (API 4000™ LC-MS/MS System, Sciex, Framingham, MA, USA ; Shimadzu UFLC System (Shimadzu, Kyoto, Japon).

L'échantillon est introduit après séparation par chromatographie en phase liquide (LC). La LC à haute pression (HPLC) est une technique de séparation des molécules d'un mélange en fonction de leur affinité respective pour la phase stationnaire et la phase mobile qui la traverse. La phase stationnaire est une silice greffée de chaînes alkyles C18, la rendant apolaire. La phase mobile, quant à elle, est un mélange de solvants organiques et de sels, et est donc polaire. Une fois sur la colonne, les analytes sont plus ou moins retenus, en fonction de leur polarité et de leur taille. Il s'agit d'une chromatographie en phase inverse.

L'analyse par injection en flux continue (*flow injection analysis*, FIA) est également utilisée : l'échantillon est introduit à travers l'injecteur LC, mais sans utiliser de colonne. Cette technique permet d'injecter par le passeur d'échantillon, une boucle de solvant à un débit donné.

L'ionisation des molécules est réalisée par électro-nébulisation (*electrospray ionisation*, ESI). Les gouttelettes de solutés sont formées à l'extrémité d'un fin capillaire porté à un potentiel élevé à pression atmosphérique. Elles ont une densité de charge importante en raison du champ électrique intense. Ce champ transforme l'effluent liquide en un nuage de fines gouttelettes (spray) chargées en fonction du mode d'ionisation. Les gouttelettes s'évaporent lentement en raison d'un courant d'air chauffé. Elles explosent lorsqu'elles ont une densité de charge trop élevée, libérant des

microgouttelettes constituées de molécules protonées ou déprotonées de l'analyte, qui portent un nombre de charges variable (**Figure 71**).

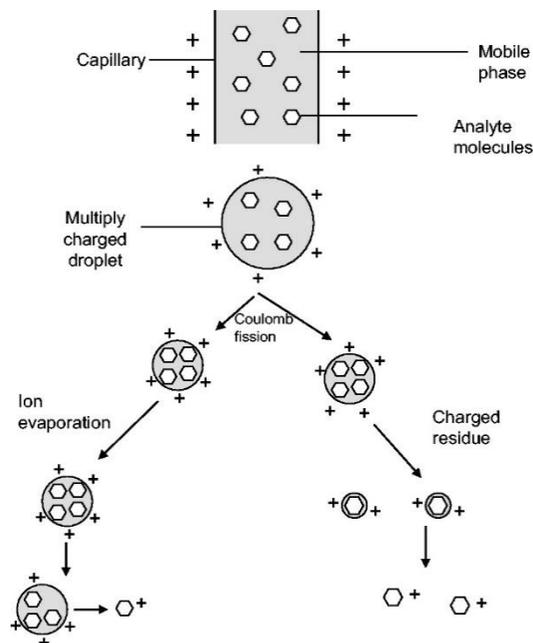


Figure 71. Formation d'ions.

Les analytes d'intérêt sont présents dans la phase mobile et sont nébulisés à l'aide d'azote gazeux chauffé pour former un spray à l'extrémité du capillaire afin de produire des gouttelettes chargées. Les gouttelettes chargées subissent une fission de Coulomb et produisent des gouttelettes plus petites.<sup>641</sup>

Les ions produits arrivent à une interface pression atmosphérique/vide où le gaz rideau (*Curtain Gas interface*, **Figure 72**), de l'azote ultra pur, empêche les molécules non ionisées de progresser. Les ions chargés sont focalisés sur un système multipolaire radiofréquence (Q0, **Figure 72**) sous l'influence d'une variation de potentiel électrique et d'un pompage différentiel. Les ions précurseurs présélectionnés sont ensuite attirés dans l'analyseur qui est un triple quadripôle.

Un quadripôle est constitué de quatre électrodes parallèles de forme cylindrique. Les électrodes opposées sont soumises au même potentiel. Les électrodes adjacentes sont soumises à des potentiels de même valeur mais opposés (deux électrodes avec un potentiel négatif, deux avec un potentiel positif), et la polarité des barres s'inverse en continu. Les forces de répulsion-attraction mais aussi la vitesse dans le quadripôle (énergie cinétique) imposent aux ions une trajectoire hélicoïdale. En fonction des tensions appliquées, les ions auront une trajectoire stable dans le quadripôle et seront analysés, tandis que d'autres auront une trajectoire instable. Un triple quadripôle consiste en l'association de deux analyseurs quadripolaires en série, séparés par une cellule de collision, souvent un quadripôle plus court. Lors d'une acquisition en MS/MS, le premier quadripôle permet de sélectionner un ion, le second, rempli de gaz inerte à pression élevée, permet de fragmenter l'ion et le troisième effectue une deuxième séparation des ions fils générés (**Figure 73**).

Ainsi, les ions précurseurs présélectionnés sont attirés par le premier quadripôle Q1 (**Figure 72**) en fonction de leur polarité et la tension appliquée sur les barres des quadripôles, puis ils sont repoussés ou attirés vers celles-ci. Les ions précurseurs rejoignent alors le deuxième quadripôle (Q2, **Figure 72**) où de l'azote ultra pur est introduit. Il s'agit d'une cellule de collision : les ions précurseurs se fragmentent en ions fragments caractéristiques de la molécule à analyser (spectre de fragmentation unique pour chaque molécule).

Ces ions fragments sont chassés vers le dernier quadripôle (Q3, **Figure 72**), ils sont focalisés et dirigés vers le détecteur : un multiplicateur d'électrons. De cette manière, les ions séparés selon leur rapport masse/charge viennent percuter le détecteur ou cellule CEM (*Channel Electron Multiplier*, **Figure 72**) afin d'être détectés et comptabilisés.

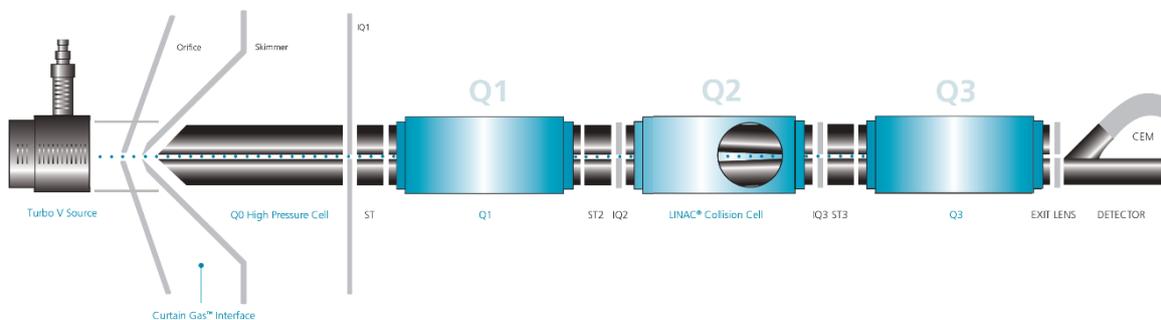


Figure 72. Schéma du triple quadripôle (Q1-Q2-Q3) du spectromètre de masse API 4000™.  
Source : <https://sciex.com/products/mass-spectrometers/triple-quad-systems/>

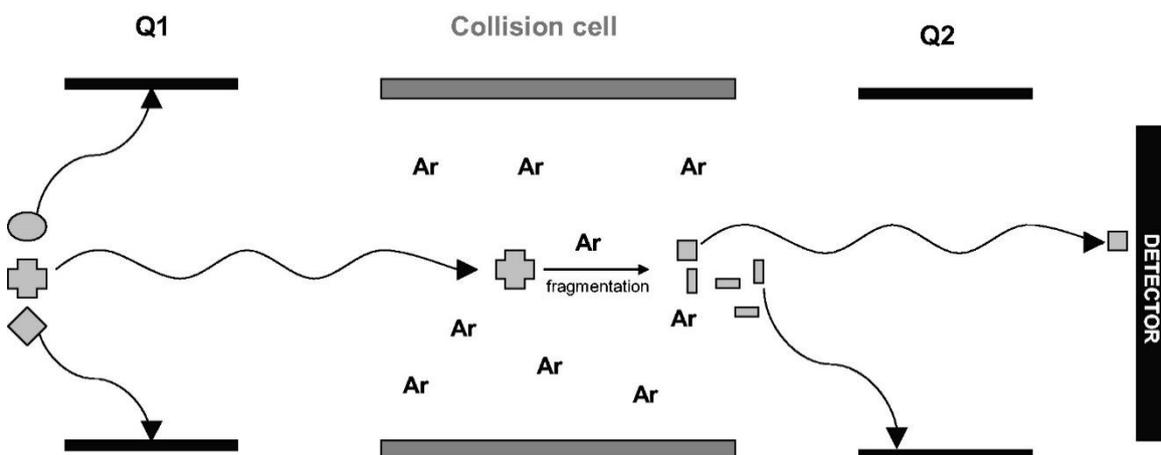


Figure 73. Principe du triple quadripôle.  
Les quadripôles Q1 et Q2 correspondent aux quadripôles Q1 et Q3 de la figure 71, respectivement.<sup>641</sup>

L'analyse métabolique ciblée, consistant en l'analyse de 188 métabolites (**Tableau 10**), a été effectuée grâce au kit commercial AbsoluteIDQ®p180 de Biocrates Life Science AG (Innsbruck, Autriche).

Tableau 10. Classes des analytes étudiés et méthode analytique.

La liste complète des 188 métabolites est disponible ici : <https://biocrates.com/wp-content/uploads/2022/02/biocrates-p180-list-of-metabolites-v2-2021.pdf>

Classe de l'analyte (nombre de métabolites)		Méthode analytique
Petites molécules (43)	Acides aminés (21)	LC-MS/MS
	Amines biogènes (21)	
	Mucopolysaccharide (1)	
Lipides (145)	Acylcarnitines (40)	FIA-MS/MS
	Glycérophospholipides (90)	
	Sphingomyélines (15)	

Le kit et les réactifs Biocrates comprennent les réactifs de préparation des échantillons, les standards internes, les calibrants, les contrôles qualité, un mélange test et une plaque filtrante brevetée de 96 puits. Le kit est un essai entièrement automatisé basé sur la dérivation par le phénylisothiocyanate (PITC) des analytes cibles dans les échantillons liquides. La quantification est réalisée à l'aide d'étalons internes marqués isotopiquement et de sept calibrants permettant d'établir une courbe d'étalonnage. Les métabolites analysés par LC-MS/MS sont quantifiés de manière absolue grâce aux calibrants, tandis que les métabolites analysés par FIA-MS/MS sont quantifiés de manière semi-quantitative, uniquement à l'aide des standards internes et des trois niveaux de contrôles qualité répartis sur la plaque analysée (**Figure 74**).

Well List		Plate View											
1035947253-1													
Zoom %		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank 1 10000001	p180 Cal5 2 20000615	081-003_VJ 3 1035946288	M2_S_15_Fa 4 1035946361	HMN937495 5 1035946443	046-011_DP 6 1035946526	M2_S_19_Fa 7 1035946609	150-001_LC 8 1035946671	M2_S_40_Fa 9 1035945600	M2_S_09_Co 10 1035945686	M2_S_13_Fa 11 1035945769	M2_S_02_Co 12 1035947171	
B	PBS 13 11000002	p180 Cal6 14 20000616	150-002_NR 15 1035946292	M2_S_45_Fa 16 1035946375	M2_S_05_Co 17 1035946458	M2_S_07_Co 18 1035946531	159-005_SJ 19 1035946613	M2_S_42_Fa 20 1035946685	M2_S_43_Fa 21 1035945614	150-008_CA 22 1035945691	150-001_LC 23 1035947109	M2_S_06_Co 24 1035947185	
C	PBS 25 11000002	p180 Cal7 26 20000617	M2_S_04_Co 27 1035946303	M2_S_38_Fa 28 1035946380	01_192_Prog 29 1035946462	117-006_MC 30 1035946545	M2_S_08_Co 31 1035946628	M2_S_32_Fa 32 1035946690	M2_S_03_Co 33 1035945629	M2_S_18_Fa 34 1035945701	040-007_RB 35 1035947113	M2_S_23_Fa 36 1035947190	
D	PBS 37 11000002	p180 QC1 38 1020164621	150-003_LI 39 1035946318	159-009_VB 40 1035946394	046-011_DP 41 1035946477	M2_S_27_Fa 42 1035946550	M2_S_01_Co 43 1035946632	042-001_RM 44 1035946701	M2_S_44_Fa 45 1035945633	M2_S_14_Fa 46 1035945716	117-009_OI 47 1035947128	081-003_VJ 48 1035947201	
E	p180 Cal1 49 20000611	p180 QC2 50 1020164635	M2_S_28_Fa 51 1035946322	M2_S_12_Fa 52 1035946405	M2_S_37_Fa 53 1035946481	M2_S_10_Fa 54 1035946564	M2_S_21_Fa 55 1035946647	150-005_RR 56 1035946715	156-004_PR 57 1035945648	01_037_W6 58 1035945721	150-003_LI 59 1035947132	M2_S_11_Fa 60 1035947215	
F	p180 Cal2 61 20000612	p180 QC3 62 1020164640	159-007_BC 63 1035946337	M2_S_20_Fa 64 1035946410	046-003_GX 65 1035946496	M2_S_16_Fa 66 1035946579	150-002_NR 67 1035946651	M2_S_24_Fa 68 1035946720	M2_S_30_Fa 69 1035945652	M2_S_39_Fa 70 1035945735	117-009_OI 71 1035947147	156-004_PR 72 1035947220	
G	p180 Cal3 73 20000613	159-009_VB 74 1035946269	M2_S_34_Fa 75 1035946341	M2_S_29_Fa 76 1035946424	150-006_GJ 77 1035946507	M2_S_31_Fa 78 1035946583	p180 QC2 79 1020164635	159-019_DT 80 1035945584	M2_S_17_Fa 81 1035945667	150-006_GJ 82 1035945740	150-005_RR 83 1035947151	M2_S_22_Fa 84 1035947234	
H	p180 Cal4 85 20000614	M2_S_36_Fa 86 1035946273	M2_S_25_Fa 87 1035946356	M2_S_26_Fa 88 1035946439	M2_S_33_Fa 89 1035946511	150-008_CA 90 1035946598	042-001_RM 91 1035946666	M2_S_41_Fa 92 1035945599	040-007_RB 93 1035945671	076-007_LF 94 1035945754	M2_S_35_Fa 95 1035947166	p180 QC2 96 1020164635	

Figure 74. Plan d'une plaque du kit AbsoluteIDQ p180.

La plaque est composée de 96 puits pour un blanc (B), trois zéros (PBS), 7 niveaux de calibrants (Cal1 à Cal7), 3 niveaux de contrôle qualité (QC1 à QC3) et de 80 échantillons.

La première étape consiste à mélanger le mix de standards internes et l'échantillon (seuls 10 µL sont nécessaires). Ce mélange est déposé dans la partie supérieure la plaque filtrante et séché sous courant d'azote. La dérivation des acides aminés et des amines biogènes est ensuite complétée par l'ajout de 50 µL d'une solution de PITC à 5%, incubation et à nouveau séchage. Après incubation avec le solvant d'extraction, les échantillons sont filtrés par centrifugation et recueillis dans la partie inférieure de la plaque. Ils sont ensuite dilués avec de l'eau pour l'analyse en LC-MS/MS, avec la phase mobile pour l'analyse en FIA-MS/MS (Figure 75).

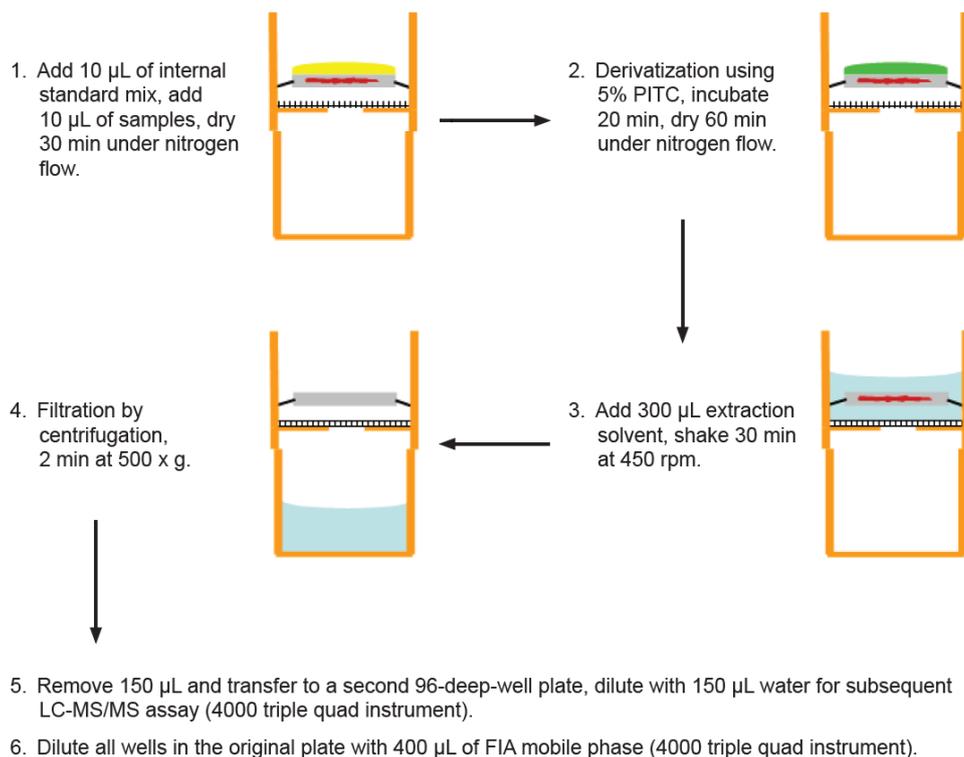


Figure 75. Étapes de préparation des échantillons pour l'analyse par kit Biocrates AbsoluteIDQ®p180.

La phase mobile utilisée pour l'analyse en LC-MS/MS est un mélange d'acétonitrile et d'eau acidifié à 0,2% ; la phase mobile pour l'analyse en FIA est un mélange de méthanol et de modifiant fourni dans le kit. Les analyses sont ensuite effectuées conformément aux instructions du fabricant du kit. L'acquisition et le traitement des données (intégration des pics) sont réalisés par le logiciel Analyst 1.5 (Sciex) et l'analyse et le contrôle des données qualités par le logiciel MetIDQ (Biocrates).

-----

Ces analyses sont toutes effectuées au sein du laboratoire de Biochimie Métabolique du CHU de Rouen et/ou utilisées dans le cadre de l'activité clinique, notamment pour le diagnostic de MHM, soulignant ainsi l'intérêt des approches omiques dans la médecine d'aujourd'hui.



## OBJECTIFS DE LA THESE

À l'ère de la médecine de précision, l'avènement récent des sciences omiques permet d'extraire des données biologiques à partir d'un système biologique de façon globale avec une approche ciblée ou non ciblée. Ces nouvelles techniques peuvent notamment aider (i) à comprendre les mécanismes physiopathologiques d'une maladie ou d'action d'un traitement, (ii) à identifier de nouveaux biomarqueurs et (iii) à identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Dans le cadre de ce travail, nous avons comme objectif de mettre en œuvre ces sciences omiques dans la maladie de Fabry.

La maladie de Fabry est une maladie lysosomale rare. Son incidence est probablement sous-estimée car son phénotype est peu spécifique. Cependant un diagnostic précoce a un impact important sur le pronostic fonctionnel et vital des patients.

Bien que des biomarqueurs et des traitements soient disponibles, ceux-ci ne sont pas entièrement satisfaisants. Actuellement, un seul biomarqueur est utilisé en clinique, le lyso-Gb3. Il est à noter que celui-ci n'est pas pertinent pour le diagnostic de certaines femmes Fabry et de patients avec certains variants du gène *GLA*. De plus, ce n'est pas un bon marqueur de l'évolution de la maladie sous traitement. Les traitements disponibles ont certes permis d'améliorer le pronostic des patients et de ralentir le processus pathologique, mais ils ne permettent pas une réversion du phénotype complet.

Ces constats sont étroitement liés à la complexité de la maladie, au rôle du lysosome dans de nombreuses voies métaboliques cellulaires, et à la connaissance incomplète des processus physiopathologiques impliqués au-delà de la surcharge lysosomale en substrat.

La première partie du travail consiste en l'analyse du transcriptome de cellules Fabry par rapport à des cellules contrôles. L'objectif est d'explorer les mécanismes physiopathologiques grâce à un modèle cellulaire de maladie de Fabry, des podocytes humains immortalisés KO pour le gène *GLA*, fournis par l'équipe du Dr Weisz de l'*University of Pittsburgh School of Medicine*, comparés à des cellules contrôles. Une étude de repositionnement de médicament est également en cours.

Le second objectif consiste à élucider le statut de deux protéines, FGF2 et IL-7, dans la maladie de Fabry. En effet, notre équipe avait rapporté une augmentation spécifique de ces deux molécules dans les plasmas d'une cohorte de patients Fabry français par une approche protéomique ciblée (Tebani *et al.* J Clin Med. 2020<sup>288</sup>). Nous avons pu obtenir les plasmas d'une cohorte indépendante de 56 patients suisses afin de confirmer et valider les premiers résultats. Par ailleurs, nous avons souhaité caractériser

l'effet de ces protéines sur le traitement par enzymothérapie substitutive des podocytes Fabry comparés à des podocytes contrôles non traités, par une approche de métabolique ciblée dans les cellules (résultats présentés ici) et dans le milieu de culture (étude en cours).

## PARTIE II : SECTION EXPERIMENTALE



# CHAPITRE I : « Genome-wide expression analysis in a Fabry disease human podocyte cell line »

## I. Contexte

De nouveaux biomarqueurs sont nécessaires pour mieux stratifier et surveiller les patients atteints de maladie de Fabry. Les approches omiques, en particulier l'analyse transcriptomique, offrent des perspectives pour mieux comprendre la maladie, alors que leur utilisation dans cette pathologie est encore limitée dans la littérature.

## II. Objectifs

Cette étude vise à examiner les mécanismes sous-jacents de la dysfonction des podocytes dans la maladie de Fabry en utilisant une analyse de l'expression génomique par RNA-seq. Cette analyse a été effectuée dans des lignées cellulaires humaines de podocytes immortalisés de patients ayant une maladie de Fabry et de patients contrôles. Les podocytes sont un type cellulaire clé dans la maladie de Fabry avec une atteinte précoce et un rôle essentiel dans la néphropathie, les reins étant une cible majeure de cette pathologie<sup>642</sup>. Les cellules Fabry ont été obtenues par technique CRISPR-Cas9 par l'équipe du Dr Weisz (*University of Pittsburgh School of Medicine*) à partir de cellules contrôles<sup>560</sup>.

## III. Résultats

L'analyse différentielle de l'expression génique entre les cellules Fabry et cellules contrôles a permis d'identifier 247 gènes exprimés de manière différentielle (valeur de p ajustée < 0,05), avec 136 gènes sous-exprimés et 111 gènes surexprimés dans les cellules de Fabry par rapport aux contrôles.

Une analyse non supervisée en fonction des profils d'expression a révélé une tendance claire de regroupement des échantillons Fabry d'une part et contrôles d'autre part.

Les gènes différentiellement exprimés ont été triés en fonction de leur niveau de sur- ou sous-expression. Les 10 gènes les plus surexprimés sont *MAGEH1*, *DHRS4L2*, *LY6K*, *CBR3*, *CCDC80*, *EBP*, *PLEKHO1*, *QPCTL*, *PDZD7* et *SIL1*. Les 10 gènes les plus sous-exprimés sont *COL7A1*, *PDE10A*, *ITGB3*, *N4BP2*, *AFF1*, *STRN*, *TIA1*, *MOB1A*, *SMG1* et *FARP2*. Ces gènes sont impliqués dans diverses voies

métaboliques cellulaires telles que le stress oxydatif, le métabolisme des acides gras, l'inflammation, les voies de signalisation Wnt et Hippo, l'apoptose et l'autophagie.

La génération d'un réseau métabolique à l'échelle du génome (*genome-scale metabolic modeling*) a été réalisée à partir des données transcriptomiques. Ce réseau a montré des changements importants dans le flux métabolique, avec 479 métabolites affectés de manière significative. Certains métabolismes, comme celui des phospholipides et de la dégradation du sulfate d'héparane, sont régulés à la baisse, tandis que d'autres, comme le métabolisme des acides gras, des acides aminés, du glucose, des nucléotides, des eicosanoïdes et des œstrogènes sont régulés à la hausse.

Ce travail a été réalisé en collaboration avec le *Science for Life Laboratory* du KTH – *Royal Institute of Technology* de Stockholm et le *Centre for Host-Microbiome Interactions* du *King's College* de Londres.

Au moment de soumettre le manuscrit, une étude parue dans le *Journal of Clinical Investigation* a mis en évidence par une approche protéomique et transcriptomique dans des podocytes Fabry la persistance d'une dysfonction lysosomale malgré un traitement par enzymothérapie substitutive et la réduction de la quantité de Gb3 accumulé<sup>55</sup>. Les auteurs ont identifié l'accumulation d' $\alpha$ -synucléine comme l'événement clé de l'atteinte podocytaire. Ils ont alors effectué une analyse de *connectivity mapping* du profil transcriptomique des podocytes Fabry afin de réaliser un repositionnement de médicaments. Ils ont ainsi identifié un agoniste du récepteur  $\beta$ 2-adrenergic (l'orciprénaline) comme le principal composé permettant de corriger le profil transcriptomique d'une lignée cellulaire invalidée pour le gène *GLA*.

Le repositionnement d'un médicament (*drug repositioning* ou *drug repurposing*) est l'utilisation d'un médicament dans une indication autre que celle pour laquelle il a été initialement mis sur le marché.

Nous avons donc différé la soumission de notre article afin de réaliser une étude de repositionnement de médicaments avec la même approche de *connectivity mapping* du profil transcriptomique à l'aide de l'outil *Repurposing* de la plateforme CLUE (<https://clue.io/>). Nous avons mis en évidence un composé déjà commercialisé et prédit comme permettant de corriger le profil d'expression Fabry avec une significativité importante (relative score - 40 %, *negative log10 transformed FDR q value* : 15,6) dans une lignée cellulaire rénale. L'identité de cette molécule n'est pas divulguée ici à des fins de valorisation et sera nommée CRAI par la suite. Il agit sur une voie qui a déjà été impliquée dans la fibrose rénale, la dysfonction mitochondriale dans le tubule rénal et le vieillissement rénal.

À partir de ces données, nous avons réalisé une expérience de validation utilisant des podocytes Fabry et des podocytes contrôles. Les cellules ont été cultivées jusqu'à confluence puis trypsinées. Elles ont été transférées dans de nouvelles boîtes à une densité de 10 000 cellules/cm<sup>2</sup>. Une fois les cellules à

confluence, les traitements ont été rajoutés au milieu de culture. Les cellules ont ensuite été récupérées et centrifugées 24 heures plus tard. Le surnageant et le culot cellulaire ont été congelés à -80°C. Les différents traitements utilisés sont :

- CRAI à 10  $\mu$ M
- Agalsidase alfa 1 mg/mL (REPLAGAL, Takeda) à 5  $\mu$ L/mL
- Bafilomycine à 100 nM, un macrolide et inhibiteur puissant et sélectif de la V-ATPase

Les groupes de traitement étaient :

- Podocytes Fabry non traités
- Podocytes Fabry + CRAI
- Podocytes Fabry + agalsidase- $\alpha$
- Podocytes Fabry + agalsidase- $\alpha$  + CRAI
- Podocytes Fabry + Bafilomycine
- Podocytes contrôles non traités
- Podocytes contrôles + CRAI
- Podocytes contrôles + agalsidase- $\alpha$
- Podocytes contrôles + agalsidase- $\alpha$  + CRAI
- Podocytes contrôles + Bafilomycine

L'évaluation de l'effet sera réalisée en mesurant la concentration d' $\alpha$ -synucléine à l'aide d'un kit ELISA et de LC3-II, un marqueur de l'autophagie, par Western-Blot. L'article sera soumis dès que les résultats auront été obtenus et interprétés.

#### IV. Conclusion

La compréhension des mécanismes sous-jacents de la maladie de Fabry est cruciale pour permettre un diagnostic précoce, améliorer le pronostic, assurer un suivi fiable et développer des traitements efficaces. La transcriptomique couplée à la modélisation métabolique à l'échelle du génome à l'aide d'une lignée cellulaire de podocytes, offre une approche puissante et appropriée pour répondre à ces problématiques. En analysant les modèles d'expression génique et en simulant les altérations métaboliques, nous avons cherché à découvrir les principaux changements moléculaires associés à la maladie de Fabry et à faire progresser nos connaissances sur cette pathologie. Cette approche puissante intègre des techniques de modélisation informatique avec des données d'expression génique à grande échelle pour créer des représentations informatiques complètes de systèmes

biologiques entiers et pour mieux comprendre les processus cellulaires dynamiques et leur régulation. Parmi les voies de signalisation impactées dans les podocytes Fabry, la voie de signalisation Hippo est interconnectée avec la voie de signalisation Wnt et joue un rôle dans la régulation de l'immunité innée et adaptative et l'équilibre croissance/mort cellulaire<sup>643,644</sup>. Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour explorer l'implication potentielle de la signalisation Hippo ou de ses effecteurs en aval dans la maladie de Fabry. Une atteinte de la voie de l'autophagie a également été mise en évidence, en accord avec la perturbation du flux autophagique démontrée par notre laboratoire<sup>287</sup>. La modélisation métabolique suggère une modification de la composition ou de l'intégrité de la membrane cellulaire et des interactions cellulaires avec la matrice extracellulaire, un changement dans l'utilisation de l'énergie cellulaire, une biosynthèse accrue de molécules clés, ainsi que des processus de signalisation, une réponse immunitaire et une régulation du stress oxydatif potentiellement altérés. Dans l'ensemble, ces résultats fournissent des informations précieuses sur les perturbations métaboliques qui se produisent dans la maladie de Fabry.

De nouvelles conclusions pourront être apportées par les résultats du repositionnement de médicaments.

# Genome-wide expression analysis in a Fabry disease human podocyte cell line

Sarah Snanoudj<sup>1</sup>, Céline Derambure<sup>2</sup>, Cheng Zhang<sup>3</sup>, Céline Lesueur<sup>1</sup>, Lénaïg Abily-Donval<sup>4</sup>, Stéphane Marret<sup>4</sup>, Hong Yang<sup>3</sup>, Adil Mardinoglu<sup>3, 5</sup>, Soumeya Bekri<sup>1</sup>, Abdellah Tebani<sup>1\*</sup>

## Affiliations

- <sup>1</sup> Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM U1245, CHU Rouen, Department of Metabolic Biochemistry, 76000 Rouen, France; [sarah.snanoudj@chu-rouen.fr](mailto:sarah.snanoudj@chu-rouen.fr) (S.S.); [celine.lesueur@chu-rouen.fr](mailto:celine.lesueur@chu-rouen.fr) (C.L.); [abdellah.tebani@chu-rouen.fr](mailto:abdellah.tebani@chu-rouen.fr) (A.T.); [soumeya.bekri@chu-rouen.fr](mailto:soumeya.bekri@chu-rouen.fr) (S.B.)
- <sup>2</sup> Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM U1245 and CHU Rouen, Department of Genetics and reference center for developmental disorders, FHU-G4 Génomique, F-76000, Rouen, France; [celine.derambure1@univ-rouen.fr](mailto:celine.derambure1@univ-rouen.fr) (C.D.)
- <sup>3</sup> Science for Life Laboratory, KTH - Royal Institute of Technology, Stockholm, Sweden; [adilm@scilifelab.se](mailto:adilm@scilifelab.se) (A.M.); [cheng.zhang@scilifelab.se](mailto:cheng.zhang@scilifelab.se) (C.Z.)
- <sup>4</sup> Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM U1245, CHU Rouen, Department of Neonatal Pediatrics, Intensive Care, and Neuropediatrics, 76000 Rouen, France; [lenaig.donval@gmail.com](mailto:lenaig.donval@gmail.com) (L.A.D.); [stephane.marret@chu-rouen.fr](mailto:stephane.marret@chu-rouen.fr) (S.M.)
- <sup>5</sup> Centre for Host-Microbiome Interactions, Faculty of Dentistry, Oral & Craniofacial Sciences, King's College London, London, United Kingdom; [adilm@scilifelab.se](mailto:adilm@scilifelab.se) (A.M.)

\* Correspondence

Dr. Abdellah TEBANI

Department of Metabolic Biochemistry,

Rouen University Hospital

76000 Rouen Cedex

France

[abdellah.tebani@chu-rouen.fr](mailto:abdellah.tebani@chu-rouen.fr)

## Abstract

**Background:** Fabry disease (FD) is an X-linked lysosomal disease caused by an enzyme deficiency of alpha-galactosidase A ( $\alpha$ -gal A). This deficiency leads to the accumulation of glycosphingolipids in lysosomes, resulting in a range of clinical symptoms. The complex pathogenesis of FD involves lysosomal dysfunction, altered autophagy, and mitochondrial abnormalities. Omics sciences, particularly transcriptomic analysis, comprehensively understand molecular mechanisms underlying diseases. This study focuses on genome-wide expression analysis in an FD human podocyte model to gain insights into the underlying mechanisms of podocyte dysfunction.

**Material and Methods:** Human control and Fabry podocytes were used. Gene expression data was generated using RNA-seq analysis (Illumina). Differential expression analysis was done using DESeq2. Principal component analysis and Spearman correlation have explored gene expression trends. Functional enrichment and Reporter metabolite analyses were conducted to identify significantly affected metabolites and metabolic pathways.

**Results:** Differential expression analysis revealed 247 genes with altered expression levels in Fabry podocytes compared to control podocytes. Among these genes, 136 were underexpressed, and 111 were overexpressed in Fabry cells. Functional analysis of differentially expressed genes showed their involvement in various pathways related to oxidative stress, inflammation, fatty acid metabolism, collagen and extracellular matrix homeostasis, kidney injury, apoptosis, autophagy, and cellular stress response.

**Conclusion:** The study provides insights into molecular mechanisms underlying Fabry podocyte dysfunction. Integrating transcriptomics data with genome-scale metabolic modeling further unveiled metabolic alterations in Fabry podocytes. This comprehensive approach contributes to a better understanding of Fabry disease and may lead to identifying new biomarkers and therapeutic targets for this rare lysosomal disorder.

**Keywords:** Fabry disease; RNAseq; Transcriptomics; Metabolic modeling; Systems biology; Podocyte

## Introduction

Fabry disease (FD, OMIM 301500) is an X-linked lysosomal disease (LD) caused by a deficiency of alpha-galactosidase A ( $\alpha$ -D-galactoside galactohydrolase, EC 3.2.1.22;  $\alpha$ -gal A) encoded by the *GLA* gene. This enzyme is involved in the degradation of glycosphingolipids<sup>1</sup>. Glycosphingolipids are essential constituents of cell membranes and are widely distributed in human tissues<sup>2</sup>.  $\alpha$ -gal A deficiency results in the progressive and systemic accumulation of globotriaosylceramide (Gb<sub>3</sub> or GL-3) and other related glycosphingolipids in lysosomes<sup>3</sup>. The emergence of new multifaceted roles of the lysosome in several cellular processes and its primary function of macromolecule degradation sheds light on the mechanisms underlying FD and LDs in general. Thus, lysosomes participate in vital processes such as antigen presentation, cell adhesion, apoptotic cell death, interorganellar communication, and gene regulation. In addition, lysosomes are highly mobile within the cell enabling the interaction with various cellular compartments and maintaining cellular homeostasis. The diverse range of functions and interactions introduces a layer of biological complexity to these organelles<sup>4</sup>. A continuum of clinical severity is observed in FD, with the molecular abnormality and the sex of the patient being essential determinants. The severity range spans from a severe classical phenotype to moderate nonclassical phenotype<sup>5</sup>. The classical phenotype is mostly seen in men. Symptoms encompass neuropathic pain, cornea verticillata, angiokeratoma, gastrointestinal involvement, sweating anomalies, hearing loss, hypertrophic cardiomyopathy, cardiac rhythm disorders, progressive renal failure, and stroke, with an onset in infancy<sup>6,7</sup>. The nonclassical phenotype is milder with a later onset, a more variable course of the disease, and can be limited to one or a small number of organs. Despite the X-linked inheritance pattern, women often have signs and symptoms of FD related to random and/or skewed X inactivation, but are usually less severely affected compared to men<sup>8</sup>. Reported incidences range from 1 in 476,000<sup>9</sup> to 1 in 117,000<sup>10</sup> in the general population but may be largely underestimated as shown by newborn screening programs with prevalences as high as 1 in 3,100 newborns in Italy<sup>11</sup> and 1 in 1,500 newborn males in Taiwan<sup>12</sup>. Diagnosis of Fabry disease relies on a deficient  $\alpha$ -gal A activity in plasma, leukocytes<sup>13</sup> or dried blood spot<sup>14</sup> in males, confirmed by genotyping. Affected women can exhibit an enzyme activity within the normal range and diagnosis rests on molecular analysis of the *GLA* gene<sup>15</sup>. Available treatment options are enzyme replacement therapy (ERT: agalsidase beta, Fabrazyme®; agalsidase alfa, Replagal®<sup>16</sup>), oral chaperone therapy (Migalstat, Galafold®<sup>17</sup>), and conventional medical treatment to manage the morbidities related to the disease. Phenotype-genotype correlation is partial in FD and the relationship between genotype and quantitative difference levels of substrates in tissues is still not well understood, thus causing different effects on organ changes<sup>18</sup>. Studies have shown that lyso-Gb<sub>3</sub> (globotriaosylsphingosine), converted from Gb<sub>3</sub> by acid ceramidase within tissues, is a better biomarker than Gb<sub>3</sub>. It is the only available specific biomarker of FD<sup>19</sup> and is primarily used in the context of initial FD diagnosis. Plasma lyso-Gb<sub>3</sub> levels have also been partially correlated with disease severity<sup>20,21</sup>. However, it has not been validated for treatment monitoring and has been shown to not correlate with disease progression or prognosis in treated patients<sup>22</sup>. New specific biomarkers are therefore needed to better classify and monitor Fabry patients. FD pathogenesis is complex and encompasses multiple pathological mechanisms, including but not limited to lysosomal dysfunction, altered autophagy and mitochondrial abnormalities<sup>23</sup>. Better understanding of the pathways involved could result in improved prognosis and yield new biomarkers and therapeutic targets. The rise of omics sciences has prompted a paradigm shift, in both research and medicine<sup>24-26</sup>. These approaches may bring new insights into the pathophysiology of rare<sup>27,28</sup> and multifactorial complex diseases<sup>29</sup>. Among omics sciences, transcriptomic analysis offers a global picture and may enable to explore the molecular mechanisms underlying diseases<sup>30,31</sup>. Kidneys are a central organ target in FD and podocytes are a key cellular type in Fabry related nephropathy, with significant Gb<sub>3</sub> and lyso-Gb<sub>3</sub> accumulation, glycolipid deposits and early signs of injury<sup>32</sup>. This

study aims to perform genome-wide expression analysis in an FD human podocyte model compared to control podocytes to gain insight into the underlying mechanisms of podocyte dysfunction.

## Material and methods

### *Podocyte Culture*

Our study used human immortalized podocytes kindly provided by Dr. Weisz's team<sup>33</sup>. Two types of cells were used: control podocytes (C1 to C9) and Fabry podocytes (F1 to F9), obtained by CRISPR/Cas9 technology. The cells were incubated at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> in Dulbecco's modified Eagles Medium: Nutrient Mixture F-12 or DMEM/F-12 (PAN BIOTECH, P04-41450) supplemented with 10% fetal bovine serum – FBS (Eurobio, CVFSVF00-01), 1% glutamine 200nM (Eurobio, CSTGLU00-0U), 1% penicillin 100 UI/ml and streptomycin 100 µg/ml (Sigma-Aldrich, P0781), and 0.1% ITS cell culture supplement (PAN BIOTECH, P07-03110). Medium was exchanged every 2 to 3 days.

### *RNA extraction and RNA-seq analysis*

RNA samples from both cell lines were sequenced at the Rouen University Hospital genomic platform, Rouen, France. Total RNA from podocytes was extracted using NucleoSpin® RNA/Protein kit with a DNase treatment step to avoid contamination with genomic DNA. The quality and quantity of RNA were assessed using a NanoDrop One spectrophotometer (ThermoFischer Scientific, Waltham, MA, USA). Libraries were prepared using the NEBNext Ultra II Directional RNA Library Kit with polyA RNA selection (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). One µg of total RNA was used. High-throughput sequencing of the libraries was performed on an Illumina NextSeq 500 (Illumina, San Diego, CA, USA) using 2\*75 bp sequencing to generate 30M read pairs on average per sample. Bioinformatics analysis was carried out using nf-core/RNA-seq v3.1 analysis pipeline to generate multi quality control report that uses the STAR v2.6.1d and SALMON v1.4.0 tools for alignment<sup>34</sup>. Visual exploration of the BAM files was performed with the IGV tool from the Broad Institute.

### *Data analysis*

Transcript expression levels were calculated as both raw counts and as transcript per million (TPM). Gene expression levels were calculated by summing up all the TPM values of all alternatively spliced protein coding transcripts of the corresponding gene for a total number of 19,670 protein-coding genes. The average TPM values are used to estimate the gene expression level. All TPM values were TMM normalized<sup>35</sup> between all the samples. Expression level cut-off was set at 1 TPM. A total number of 11,798 genes were expressed at 1 TPM or higher in all samples. The full TPM data matrix is shown in **Supplementary table 1**. Differential expression analysis was conducted by using mRNA raw counts. The DESeq2 R package<sup>36</sup> was used for differential analysis. Genes that had an adjusted p-value less than 0.05 with the "Benjamini-Hochberg" method were identified as differentially expressed genes. Data analysis and visualization was performed using R (version 4.0.0)<sup>37</sup>. Clustering in heatmaps and dendrograms based on Spearman correlation were created by first calculating a correlation matrix of Spearman's  $\rho$ <sup>38</sup>. The correlation was converted to a distance metric ( $1 - \rho$ ) and was clustered using unsupervised top-down hierarchical clustering. Dendrograms showing gene expression in heatmaps were clustered using the Ward2 algorithm. Ward's minimum variance method<sup>39</sup> was implemented as "Ward.D2" in the hclust function in the R package stats. Principal Component Analysis (PCA) was performed on log transformed values ( $\log(\text{TPM} + 1)$ ) using the R package pcaMethods<sup>40</sup>.

## Reporter Metabolite and Subnetwork Analysis

A reporter metabolite analysis<sup>41</sup> was performed based on the differential analysis results between Fabry and control cell lines. In brief, this method is used to identify significantly affected metabolites based on the significance of gene changes and topology of genome-scale metabolic models (GEMs). The differential gene expression results were obtained as described above, and the generic human metabolic model generated was used as input for reporter metabolite analysis. The reporter subnetwork was also retrieved using the previously published method, removing 20 currency metabolites connected to too many reactions. The deleted currency metabolites were “H<sub>2</sub>O”, “CO<sub>2</sub>”, “O<sub>2</sub>”, “H<sup>+</sup>”, “HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>”, “Na<sup>+</sup>”, “CoA”, “Pi”, “PPi”, “AMP”, “ADP”, “ATP”, “NAD<sup>+</sup>”, “NADH”, “NADP<sup>+</sup>”, “NADPH”, “PAP”, “PAPS”, “FAD”, and “FADH<sub>2</sub>.”

## Results

### Differential expression analysis

This work uses RNAseq data to explore genome expression profile differences between Fabry and control podocytes. In total 11,798 genes (60% of all putative protein-coding genes) were expressed in all analyzed samples. The whole data matrix with sample characteristics is presented in **Supplementary Table S1**. To examine the data, we initially compared two groups; Fabry samples versus control samples. Our analysis revealed 247 genes that showed differential expression (with an adjusted p-value of less than 0.05), of which 136 genes were underexpressed and 111 genes were overexpressed in Fabry cells compared to control cells. Expressed genes were sorted according to the fold change. The complete list of genes and their related statistics are presented in **Supplementary Table S2**. The 10 most overexpressed genes were *MAGEH1*, *DHRS4L2*, *LY6K*, *CBR3*, *CCDC80*, *EBP*, *PLEKHO1*, *QPCTL*, *PDZD7*, and *SIL1*. The 10 most underexpressed genes were *COL7A1*, *PDE10A*, *ITGB3*, *N4BP2*, *AFF1*, *STRN*, *TIA1*, *MOB1A*, *SMG1*, and *FARP2* (**Figure 2A**, **Supplementary Table S2**). We analyzed the data using an unsupervised method to track how the samples cluster based on their differential expression profiles. **Figure 2A** shows the visualization of this data, while **Figure 2B** displays the covariation of genes in their related groups. The separation of samples was mostly observed on the PC1 dimension, which alone explains 66.7% of the dataset variance. The PCA scores' matrices are presented in **Supplementary Table S3**. To visualize the covariation of the top genes, we performed a Spearman correlation analysis between the differentially expressed genes. We present in **Figure 2C** a heatmap of the correlation between the top 20 genes that clearly shows two clusters, upregulated and downregulated. The total correlation matrix is presented in **Supplementary Table S4**.

To visualize the expression trends, we generated violin plots to show the top 10 upregulated and 10 downregulated genes' expression levels (**Figure 3A**). In addition, **Figure 3B** shows the functional analysis of the top differentially expressed genes that are mainly involved in the following pathways: Oxidative stress (*CBR3*, *DHRS4L2*, *SIL1*, *SMG1*, *TIA1*), NAD/NADP-dependent oxidoreductase (*CBR3*, *DHRS4L2*), inflammation (*CBR3*, *ITGB3*, *QPCTL*, *SMG1*), fatty acid metabolism (*CBR3*, *CCDC80*, *DHRS4L2*), collagen and extracellular matrix homeostasis (*CCDC80*, *COL7A1*, *ITGB3*), Wnt signaling pathway (*CCDC80*, *STRN*), kidney injury (*COL7A1*, *ITGB3*, *MAGEH1*), apoptosis (*EBP*, *MAGEH1*, *PLEKHO1*, *SMG1*, *TIA1*), Hippo signaling pathway (*ITGB3*, *MOB1A*, *PLEKHO1*, *STRN*), autophagy (*ITGB3*, *SIL1*, *STRN*, *TIA1*), and endoplasmic reticulum (ER) stress (*SIL1*).

## Generation of a genome-scale metabolic network

To investigate the comprehensive dynamics of metabolites in Fabry disease, we used the transcriptomic data to generate a genome-scale metabolic network (GEM) by integrating all known human metabolic equations and pathways<sup>42</sup>. The generated GEM showed a deep change in metabolic flux with 479 significantly affected reporter metabolites. Sixty-four were downregulated and 419 were upregulated (**Figure 4**) and **Supplementary Table S5**. Functional enrichment analyses showed that phospholipid metabolism and heparan sulfate degradation were downregulated. In contrast, fatty acid metabolism, amino acid metabolism, glucose metabolism, nucleotide metabolism, eicosanoid metabolism, estrogen metabolism, prostaglandin biosynthesis, glutathione metabolism, and leukotriene metabolism were upregulated. The full list is presented in **Supplementary Table S6**.

## Discussion

Investigating Fabry disease is crucial for early diagnosis, understanding disease mechanisms, and developing effective treatments. Blending transcriptomics and genome-scale metabolic modeling using a podocyte cell line offers a powerful and appropriate approach to address these issues. By analyzing gene expression patterns and simulating metabolic alterations we aimed to uncover key molecular changes associated with Fabry disease and advance our knowledge of this disorder. Integrating GEM and high-throughput omics data offers a powerful approach to comprehending intricate biological systems. By applying computational modeling techniques to gene expression data, we can generate comprehensive depictions of biological systems and glean valuable insights into the regulation and functioning of cellular processes<sup>43,44</sup>. To better reflect the dynamic nature of cellular processes, models can be fine-tuned by incorporating transcriptomics data. This type of data, obtained through RNA sequencing, provides information on the gene expression patterns of an organism and offers a snapshot of the genes actively expressed in a specific cell type or tissue. When combined with GEMs, transcriptomics data enables the inference of metabolic pathway activity and deeper understanding of cellular function in a given condition. The comparison between Fabry and control samples identified 247 genes with varying expression levels (adjusted p-value < 0.05). Of these genes, 136 were underexpressed and 111 were overexpressed in Fabry cells. By assessing the functional analysis of the top 10 overexpressed genes (*MAGEH1*, *DHRS4L2*, *LY6K*, *CBR3*, *CCDC80*, *EBP*, *PLEKHO1*, *QPCTL*, *PDZD7*, and *SIL1*) and the top 10 underexpressed genes (*COL7A1*, *PDE10A*, *ITGB3*, *N4BP2*, *AFF1*, *STRN*, *TIA1*, *MOB1A*, *SMG1*, and *FARP2*), it was found that Fabry podocytes were most affected in the following biological pathways: oxidative stress, inflammation, collagen and extracellular matrix (ECM) homeostasis, apoptosis, autophagy and Hippo and Wnt signaling. The overall biological remodeling revealed in Fabry cells is presented in **Figure 5**. It is worth noting that some of these genes are involved in multiple processes.

Oxidative stress is an imbalance between reactive oxygen species (ROS) and the body's antioxidant defenses. Oxidative stress can lead to cardiovascular-renal remodeling, which is a major factor in the increased illness and death rate among patients with high cardiovascular risk. In addition, oxidative stress is believed to play a crucial role in the pathophysiology of Fabry disease<sup>45,46</sup>. The study identified several genes, *CBR3*, *DHRS4L2*, *SIL1*, *SMG1*, and *TIA1*, previously associated with oxidative stress. *TIA1*, for instance, is an RNA-binding protein that plays a role in apoptotic processes. Binding to particular RNA sequences contributes to forming stress granules that help regulate cell survival and apoptosis<sup>47</sup>. *TIA1* has also been connected to the autophagy<sup>48</sup>. *CBR3*, also known as Carbonyl Reductase 3, is an enzyme that helps detoxify carbonyl compounds. Its main function is to break down reactive carbonyl species produced during oxidative stress, which helps mitigate its effects. *CBR3* is involved in various metabolic pathways such as leukotriene metabolism, prostaglandin biosynthesis,

arachidonic acid metabolism, omega-3 fatty acid metabolism, eicosanoid metabolism, and xenobiotics metabolism<sup>49</sup>. *DHRS4L2* is a part of the SDR family, which stands for short-chain dehydrogenase/reductase. Members of this family play a role in protecting cells against oxidative stress by participating in cellular antioxidant mechanisms. The *SIL1* gene, which produces the Nucleotide Exchange Factor SIL1, plays an important role in regulating the folding of proteins in the endoplasmic reticulum (ER). When exposed to oxidative stress, protein folding can become disrupted, leading to the buildup of misfolded proteins and ER stress<sup>50</sup>. The *SMG1* gene, or Suppressor of Morphogenesis in Genitalia 1, is crucial in the degradation of mRNA that contains nonsense mutations. It is also involved in pathways related to genotoxic and oxidative stress<sup>51,52</sup>. *SMG1* expression is downregulated during the inflammatory process<sup>53</sup>.

In Fabry disease, inflammation is also an important factor to consider. Chronic inflammation can be caused by Fabry disease, as there is a buildup of unprocessed glycolipid substrates. This inflammation is triggered by pathogenic cascades<sup>54</sup>. Furthermore, Fabry disease can impact the immune system and cause an over-expression of immune molecules, leading to leukocyte perturbation. The activation of innate immunity can be initiated by dendritic cells through toll-like receptors and globotriaosylceramide (Gb3) and/or globotriaosylsphingosine (lyso-Gb3). This can lead to inflammation and fibrosis<sup>55</sup>. When Gb3 accumulates in the kidneys, it can increase pro-fibrotic molecules and result in renal fibrosis<sup>56</sup>. Several top highlighted genes in this work, including *CBR3*, *ITGB3*, *SMG1*, and *QPCTL*, are also associated with inflammation. One example is *ITGB3* (Integrin Beta 3), which encodes the integrin beta-3 subunit. Integrins facilitate communication between immune cells and the extracellular matrix during the inflammatory response. Additionally, *ITGB3* is involved in autophagy by regulating the formation of autophagosomes and related signaling pathways<sup>57</sup>. Another gene is *QPCTL* (Glutaminyl-peptide cyclotransferase-like protein) which encodes a protein called glutaminyl-peptide cyclotransferase-like protein involved in post-translational modifications. *QPCTL* is upregulated in macrophages during inflammation and may participate in modulating the immune response<sup>58</sup>.

The extracellular matrix (ECM) is essential for maintaining the structural integrity of cells and provides support and stability. Additionally, it regulates cell signaling, migration, and proliferation<sup>59</sup>. Interestingly, this work has identified several ECM-related genes (*CCDC80*, *COL7A1*, *ITGB3*) that help maintain ECM homeostasis and integrity, ensuring proper structure and function. Among these genes, *CCDC80* (Coiled-Coil Domain Containing 80) is involved in ECM remodeling by contributing to collagen fibers stabilization and organization<sup>60</sup>. *COL7A1* (Collagen Type VII Alpha 1 Chain) is a major component of the anchoring fibrils within the dermal-epidermal junction. Type VII collagen is localized in the basement zone beneath stratified squamous epithelia and is an anchoring fibril between the external epithelia and the underlying stroma<sup>61</sup>. Alterations in the composition and organization of the ECM have been described in FD<sup>62</sup>. Fibrosis can occur early in target organs such as the heart and the kidney<sup>63</sup>. In the kidney, the glomerular basement membrane, a specialized ECM essential for kidney function, is altered in Fabry disease<sup>64</sup>. Gb3 accumulation disrupts the composition and organization of the glomerular basement membrane, leading to thickening, expansion and fibrosis<sup>65</sup>. Moreover, lyso-Gb3 activates Notch1 signaling, activating NFκB and transcribing proinflammatory and ECM genes<sup>66</sup>. These changes disrupt renal filtration and contribute to the development of proteinuria and renal dysfunction. Besides, some integrins have been involved in podocyte detachment from the glomerular basement membrane leading to podocyturia. Interestingly, the increase in *ITGB3* expression reported in this study is supported by the elevated urinary *ITGB3* concentration in Fabry patients compared to the control group reported by Utsimi *et al*<sup>67</sup>.

The process of programmed cell death, known as apoptosis, occurs naturally in the body to eliminate damaged or unnecessary cells. This work has identified several genes, such as *EBP*, *MAGEH1*, *PLEKHO1*, *SMG1*, and *TIA1*, that are reported to be involved in apoptosis through

various mechanisms. *MAGEH1*, a member of the *MAGE* gene family, is involved in causing caspase-dependent apoptosis of renal tubular cells through the use of nephrotoxic drugs<sup>68</sup>. Studies have shown that *PLEKHO1*, a member of the Pleckstrin homology domain-containing family, is involved in regulating apoptosis. When *PLEKHO1* is overexpressed, it promotes apoptosis<sup>69</sup>. A higher apoptotic rate has been observed in patients with FD and is directly attributed to elevated Gb3 levels<sup>70</sup>. This rate is reduced in treated patients compared to untreated ones<sup>70,71</sup>. Importantly, it has been demonstrated that podocyte injury and loss in Fabry disease is, at least, partially related to an increased apoptotic rate<sup>72</sup>.

Autophagy is another revealed process. It recycles and renews damaged components within cells. It is vital in maintaining cellular homeostasis and preventing harmful material accumulation. In Fabry disease, disruption of autophagic flux has been demonstrated, with altered autophagosome maturation contributing to the pathophysiology of the disease<sup>73</sup>. Additionally, there is a loss of mTOR kinase activity<sup>74</sup>, which further affects the regulation of autophagy. Autophagy disruption may lead to the accumulation of misfolded proteins and damaged organelles within podocytes<sup>75</sup>. Consequently, this impairment may contribute to podocyte injury and the subsequent proteinuria, hallmark of kidney dysfunction<sup>74</sup>. Among the top upregulated genes, *SIL1* (Silver homolog) is primarily known for its role in protein folding and ER homeostasis. However, recent studies have implicated *SIL1* in regulating autophagy and the clearance of misfolded proteins through the ER-associated degradation (ERAD) pathway<sup>76</sup>.

Hippo and Wnt signaling are two important pathways biology that are highlighted in this study<sup>77,78</sup>. Hippo signaling pathway plays a significant role in controlling organ size and regulating cell proliferation, apoptosis, and differentiation<sup>78</sup>. On the other hand, the Wnt signaling pathway is involved in controlling embryonic development, cell growth, and differentiation<sup>77</sup>. Both pathways have been extensively studied and are crucial in various biological processes. Among the top differentially expressed genes, *STRN* (striatin) and *MOB1A* interact in the hippo pathway<sup>79</sup>. *STRN* is involved in regulation of signal transduction pathways, mitosis and cytokinesis, cell polarity, autophagy, and protein trafficking<sup>80,81</sup>. *STRN* has also been reported as a component of the mTORC1 signaling pathway, a crucial regulator of autophagy<sup>81</sup>. Moreover, the hippo signaling is interconnected with the Wnt signaling pathway and regulates both innate and adaptive immunity<sup>82</sup>. A recent study reported that a hyper-activation of hippo pathway alters the growth/death balance and may underlie the neuronal loss in neuronopathic Gaucher disease<sup>83</sup>. In addition, other major partners in Hippo signaling are under-expressed in Fabry podocytes, such as *LATS1* and *YAP1*. Further research is needed to explore the potential involvement of Hippo signaling and its downstream effectors in Fabry disease. Recently, a drug repositioning study based on the transcriptomic profile of Fabry podocytes (n=2) was published<sup>84</sup>.

From a metabolic modeling perspective, this study revealed a striking transformation in the metabolic flux, exerting a substantial influence on 479 reporter metabolites. These metabolites are involved in various biochemical pathways and indicate significant cellular metabolism changes. Among the affected reporter metabolites, 64 displayed downregulation trends. The analysis showed changes in phospholipid metabolism, which could indicate a change in the composition or integrity of the cell membrane. Additionally, the study revealed a decrease in heparan sulfate degradation, an important component of the extracellular matrix that goes through lysosomal degradation. This suggests potential changes in cellular interactions with the ECM, which aligns with the remodeling of ECM as mentioned above. Furthermore, there was an increase in activity observed in several metabolic pathways, including fatty acid metabolism, amino acid metabolism, glucose metabolism, nucleotide metabolism, eicosanoid metabolism, estrogen metabolism, prostaglandin biosynthesis, glutathione metabolism, and leukotriene metabolism. These results suggest that the cells utilize and allocate energy differently, producing more key molecules and potentially altering signaling processes. Fatty acid and glucose metabolism are crucial for energy production, while amino acid and

nucleotide metabolism are necessary for protein synthesis and DNA/RNA production which also resonates with above-mentioned remodeling of oxidative stress and inflammation.

Overall, these results provide valuable insights into the metabolic rewiring that occurs in Fabry disease. By combining transcriptomics and genome-scale metabolic modeling, this study of Fabry disease has shed light on crucial molecular transformations underlying the disorder that confirms its high biological plasticity. The work revealed significant changes in oxidative stress, inflammation, extracellular matrix (ECM) homeostasis, apoptosis, Hippo and Wnt signaling, and autophagy pathways. Furthermore, alterations in metabolic flux, cellular energy allocation, and macromolecule degradation were observed. This illustrates the potential consequences and functional adaptations in Fabry podocytes. Further investigations into these pathways and their interplay may unravel new therapeutic targets or strategies for modulating cellular metabolism. This may open new avenues for targeted interventions, aiming to alleviate the burden of this condition and improve patient outcomes.

## References

- 1 Kok, K. *et al.* Fabry Disease: Molecular Basis, Pathophysiology, Diagnostics and Potential Therapeutic Directions. *Biomolecules* **11** (2021). <https://doi.org:10.3390/biom11020271>
- 2 Beck, M. Agalsidase alfa--a preparation for enzyme replacement therapy in Anderson-Fabry disease. *Expert Opin Investig Drugs* **11**, 851-858 (2002). <https://doi.org:10.1517/13543784.11.6.851>
- 3 Sweeley, C. C. & Klionsky, B. Fabry's Disease: Classification as a Sphingolipidosis and Partial Characterization of a Novel Glycolipid. *J Biol Chem* **238**, 3148-3150 (1963).
- 4 Ballabio, A. & Bonifacino, J. S. Lysosomes as dynamic regulators of cell and organismal homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **21**, 101-118 (2020). <https://doi.org:10.1038/s41580-019-0185-4>
- 5 Arends, M. *et al.* Characterization of Classical and Nonclassical Fabry Disease: A Multicenter Study. *J Am Soc Nephrol* **28**, 1631-1641 (2017). <https://doi.org:10.1681/ASN.2016090964>
- 6 Sheth, K. J., Werlin, S. L., Freeman, M. E. & Hodach, A. E. Gastrointestinal structure and function in Fabry's disease. *Am J Gastroenterol* **76**, 246-251 (1981).
- 7 Hoffmann, B., Schwarz, M., Mehta, A., Keshav, S. & Fabry Outcome Survey European, I. Gastrointestinal symptoms in 342 patients with Fabry disease: prevalence and response to enzyme replacement therapy. *Clin Gastroenterol Hepatol* **5**, 1447-1453 (2007). <https://doi.org:10.1016/j.cgh.2007.08.012>
- 8 Maier, E. M. *et al.* Disease manifestations and X inactivation in heterozygous females with Fabry disease. *Acta Paediatr Suppl* **95**, 30-38 (2006). <https://doi.org:10.1080/08035320600618809>
- 9 Poorthuis, B. J. *et al.* The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands. *Hum Genet* **105**, 151-156 (1999). <https://doi.org:10.1007/s004399900075>
- 10 Meikle, P. J., Hopwood, J. J., Clague, A. E. & Carey, W. F. Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA* **281**, 249-254 (1999). <https://doi.org:10.1001/jama.281.3.249>
- 11 Spada, M. *et al.* High incidence of later-onset fabry disease revealed by newborn screening. *Am J Hum Genet* **79**, 31-40 (2006). <https://doi.org:10.1086/504601>
- 12 Hwu, W. L. *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* **30**, 1397-1405 (2009). <https://doi.org:10.1002/humu.21074>
- 13 Desnick, R. J. *et al.* Fabry's disease: enzymatic diagnosis of hemizygotes and heterozygotes. Alpha-galactosidase activities in plasma, serum, urine, and leukocytes. *J Lab Clin Med* **81**, 157-171 (1973).
- 14 Chamoles, N. A., Blanco, M. & Gaggioli, D. Fabry disease: enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper. *Clin Chim Acta* **308**, 195-196 (2001). [https://doi.org:10.1016/s0009-8981\(01\)00478-8](https://doi.org:10.1016/s0009-8981(01)00478-8)
- 15 Ferri, L. *et al.* Fabry disease: polymorphic haplotypes and a novel missense mutation in the GLA gene. *Clin Genet* **81**, 224-233 (2012). <https://doi.org:10.1111/j.1399-0004.2011.01689.x>
- 16 Arends, M. *et al.* Agalsidase alfa versus agalsidase beta for the treatment of Fabry disease: an international cohort study. *J Med Genet* **55**, 351-358 (2018). <https://doi.org:10.1136/jmedgenet-2017-104863>
- 17 Hughes, D. A. *et al.* Oral pharmacological chaperone migalastat compared with enzyme replacement therapy in Fabry disease: 18-month results from the randomised phase III ATTRACT study. *J Med Genet* **54**, 288-296 (2017). <https://doi.org:10.1136/jmedgenet-2016-104178>
- 18 Hughes, D. A. Fabry disease: will markers of early disease enable early treatment and better outcomes? *Curr Opin Cardiol* **31**, 434-439 (2016). <https://doi.org:10.1097/HCO.0000000000000308>

- 19 Simonetta, I., Tuttolomondo, A., Daidone, M. & Pinto, A. Biomarkers in Anderson-Fabry Disease. *Int J Mol Sci* **21** (2020). <https://doi.org:10.3390/ijms21218080>
- 20 Nowak, A. *et al.* Genotype, phenotype and disease severity reflected by serum LysoGb3 levels in patients with Fabry disease. *Mol Genet Metab* **123**, 148-153 (2018). <https://doi.org:10.1016/j.ymgme.2017.07.002>
- 21 Arends, M. *et al.* Retrospective study of long-term outcomes of enzyme replacement therapy in Fabry disease: Analysis of prognostic factors. *PLoS One* **12**, e0182379 (2017). <https://doi.org:10.1371/journal.pone.0182379>
- 22 Bichet, D. G. *et al.* Assessment of plasma lyso-Gb3 for clinical monitoring of treatment response in migalastat-treated patients with Fabry disease. *Genet Med* **23**, 192-201 (2021). <https://doi.org:10.1038/s41436-020-00968-z>
- 23 Tuttolomondo, A. *et al.* Pathogenesis and Molecular Mechanisms of Anderson-Fabry Disease and Possible New Molecular Addressed Therapeutic Strategies. *Int J Mol Sci* **22** (2021). <https://doi.org:10.3390/ijms221810088>
- 24 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* **17** (2016). <https://doi.org:10.3390/ijms17091555>
- 25 Ahmed, Z. Multi-omics strategies for personalized and predictive medicine: past, current, and future translational opportunities. *Emerg Top Life Sci* **6**, 215-225 (2022). <https://doi.org:10.1042/ETLS20210244>
- 26 Subramanian, I., Verma, S., Kumar, S., Jere, A. & Anamika, K. Multi-omics Data Integration, Interpretation, and Its Application. *Bioinform Biol Insights* **14**, 1177932219899051 (2020). <https://doi.org:10.1177/1177932219899051>
- 27 Kerr, K. *et al.* A scoping review and proposed workflow for multi-omic rare disease research. *Orphanet J Rare Dis* **15**, 107 (2020). <https://doi.org:10.1186/s13023-020-01376-x>
- 28 Labory, J. *et al.* Multi-Omics Approaches to Improve Mitochondrial Disease Diagnosis: Challenges, Advances, and Perspectives. *Front Mol Biosci* **7**, 590842 (2020). <https://doi.org:10.3389/fmolb.2020.590842>
- 29 Sun, Y. V. & Hu, Y. J. Integrative Analysis of Multi-omics Data for Discovery and Functional Studies of Complex Human Diseases. *Adv Genet* **93**, 147-190 (2016). <https://doi.org:10.1016/bs.adgen.2015.11.004>
- 30 Suhling, M., Wolke, C., Scharf, C. & Lendeckel, U. Proteomics and transcriptomics in atrial fibrillation. *Herzschrittmacherther Elektrophysiol* **29**, 70-75 (2018). <https://doi.org:10.1007/s00399-017-0551-x>
- 31 Govaere, O. *et al.* Transcriptomic profiling across the nonalcoholic fatty liver disease spectrum reveals gene signatures for steatohepatitis and fibrosis. *Sci Transl Med* **12** (2020). <https://doi.org:10.1126/scitranslmed.aba4448>
- 32 Del Pino, M. *et al.* Fabry Nephropathy: An Evidence-Based Narrative Review. *Kidney Blood Press Res* **43**, 406-421 (2018). <https://doi.org:10.1159/000488121>
- 33 Pereira, E. M. *et al.* Characterization and phosphoproteomic analysis of a human immortalized podocyte model of Fabry disease generated using CRISPR/Cas9 technology. *Am J Physiol Renal Physiol* **311**, F1015-F1024 (2016). <https://doi.org:10.1152/ajprenal.00283.2016>
- 34 Ewels, P. A. *et al.* The nf-core framework for community-curated bioinformatics pipelines. *Nat Biotechnol* **38**, 276-278 (2020). <https://doi.org:10.1038/s41587-020-0439-x>
- 35 Robinson, M. D. & Oshlack, A. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biol* **11**, R25 (2010). <https://doi.org:10.1186/gb-2010-11-3-r25>
- 36 Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome biology* **15**, 1-21 (2014).
- 37 Team, R. C. (2020).

- 38 Spearman, C. Reprinted: The proof and measurement of association between two things (2010). *International Journal of Epidemiology* **39**, 1137-1150 (1904).
- 39 Murtagh, F. & Legendre, P. Ward's hierarchical agglomerative clustering method: which algorithms implement Ward's criterion? *Journal of classification* **31**, 274-295 (2014).
- 40 Stacklies, W., Redestig, H., Scholz, M., Walther, D. & Selbig, J. pcaMethods—a bioconductor package providing PCA methods for incomplete data. *Bioinformatics* **23**, 1164-1167 (2007).
- 41 Patil, K. R. & Nielsen, J. Uncovering transcriptional regulation of metabolism by using metabolic network topology. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 2685-2689 (2005).  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0406811102>
- 42 Bidkhorji, G. *et al.* Metabolic network-based stratification of hepatocellular carcinoma reveals three distinct tumor subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**, E11874-E11883 (2018).  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1807305115>
- 43 Mardinoglu, A., Boren, J., Smith, U., Uhlen, M. & Nielsen, J. Systems biology in hepatology: approaches and applications. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **15**, 365-377 (2018).
- 44 Mardinoglu, A., Gatto, F. & Nielsen, J. Genome-scale modeling of human metabolism—a systems biology approach. *Biotechnology journal* **8**, 985-996 (2013).
- 45 Simoncini, C. *et al.* Oxidative stress biomarkers in Fabry disease: is there a room for them? *J. Neurol.* **267**, 3741-3752 (2020).
- 46 Shen, J.-S. *et al.* Globotriaosylceramide induces oxidative stress and up-regulates cell adhesion molecule expression in Fabry disease endothelial cells. *Mol. Genet. Metab.* **95**, 163-168 (2008).
- 47 Kedersha, N. L., Gupta, M., Li, W., Miller, I. & Anderson, P. RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules. *J Cell Biol* **147**, 1431-1442 (1999). <https://doi.org/10.1083/jcb.147.7.1431>
- 48 Sanchez-Jimenez, C. & Izquierdo, J. M. T-cell intracellular antigen (TIA)-proteins deficiency in murine embryonic fibroblasts alters cell cycle progression and induces autophagy. *PLoS One* **8**, e75127 (2013). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075127>
- 49 *The Human Protein Atlas*, <<https://www.proteinatlas.org/>> (
- 50 Preusse, C. *et al.* Endoplasmic reticulum-stress and unfolded protein response-activation in immune-mediated necrotizing myopathy. *Brain Pathol* **32**, e13084 (2022).  
<https://doi.org/10.1111/bpa.13084>
- 51 Brumbaugh, K. M. *et al.* The mRNA surveillance protein hSMG-1 functions in genotoxic stress response pathways in mammalian cells. *Mol Cell* **14**, 585-598 (2004).  
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.05.005>
- 52 Gehen, S. C., Staversky, R. J., Bambara, R. A., Keng, P. C. & O'Reilly, M. A. hSMG-1 and ATM sequentially and independently regulate the G1 checkpoint during oxidative stress. *Oncogene* **27**, 4065-4074 (2008). <https://doi.org/10.1038/onc.2008.48>
- 53 Xue, L. *et al.* Glomerular Proteomic Profiles in the NZB/W F1 Hybrid Mouse Model of Lupus Nephritis. *Med Sci Monit* **25**, 2122-2131 (2019). <https://doi.org/10.12659/MSM.914365>
- 54 Rozenfeld, P. & Feriozzi, S. Contribution of inflammatory pathways to Fabry disease pathogenesis. *Mol. Genet. Metab.* **122**, 19-27 (2017).  
[https://doi.org:https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2017.09.004](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2017.09.004)
- 55 Anders, H.-J., Banas, B. & Schlöndorff, D. Signaling danger: toll-like receptors and their potential roles in kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **15**, 854-867 (2004).
- 56 Thurberg, B. L. *et al.* Globotriaosylceramide accumulation in the Fabry kidney is cleared from multiple cell types after enzyme replacement therapy. *Kidney international* **62**, 1933-1946 (2002).
- 57 Hynes, R. O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**, 673-687 (2002).  
[https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00971-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00971-6)
- 58 Coimbra, J. R. M., Moreira, P. I., Santos, A. E. & Salvador, J. A. R. Therapeutic potential of glutaminyl cyclases: Current status and emerging trends. *Drug Discov Today*, 103644 (2023).  
<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2023.103644>

- 59 Kyriakopoulou, K., Piperigkou, Z., Tzaferi, K. & Karamanos, N. K. Trends in extracellular matrix biology. *Mol. Biol. Rep.* **50**, 853-863 (2023).
- 60 Della Noce, I. *et al.* The Coiled-Coil Domain Containing 80 (ccdc80) gene regulates gadd45beta2 expression in the developing somites of zebrafish as a new player of the hedgehog pathway. *J Cell Physiol* **230**, 821-830 (2015). <https://doi.org:10.1002/jcp.24810>
- 61 Burgeson, R. E. *et al.* The structure and function of type VII collagen. *Ann N Y Acad Sci* **580**, 32-43 (1990). <https://doi.org:10.1111/j.1749-6632.1990.tb17915.x>
- 62 Weidemann, F. *et al.* Fibrosis: a key feature of Fabry disease with potential therapeutic implications. *Orphanet journal of rare diseases* **8**, 1-12 (2013).
- 63 Weidemann, F. *et al.* Fibrosis: a key feature of Fabry disease with potential therapeutic implications. *Orphanet J Rare Dis* **8**, 116 (2013). <https://doi.org:10.1186/1750-1172-8-116>
- 64 Trimarchi, H., Ortiz, A. & Sanchez-Nino, M. D. Lyso-Gb3 Increases alphavbeta3 Integrin Gene Expression in Cultured Human Podocytes in Fabry Nephropathy. *J Clin Med* **9** (2020). <https://doi.org:10.3390/jcm9113659>
- 65 Najafian, B. *et al.* Accumulation of Globotriaosylceramide in Podocytes in Fabry Nephropathy Is Associated with Progressive Podocyte Loss. *J Am Soc Nephrol* **31**, 865-875 (2020). <https://doi.org:10.1681/ASN.2019050497>
- 66 Sanchez-Niño, M. D. *et al.* Lyso-Gb3 activates Notch1 in human podocytes. *Human molecular genetics* **24**, 5720-5732 (2015). <https://doi.org:10.1093/hmg/ddv291>
- 67 Utsumi, K. *et al.* Urinary excretion of the vitronectin receptor (integrin alpha V beta 3) in patients with Fabry disease. *Clin Chim Acta* **279**, 55-68 (1999). [https://doi.org:10.1016/s0009-8981\(98\)00169-7](https://doi.org:10.1016/s0009-8981(98)00169-7)
- 68 Shin, G. T., Park, J. E. & Lee, M. J. MAGEH1 interacts with GADD45G and induces renal tubular cell apoptosis. *PLoS One* **16**, e0260135 (2021). <https://doi.org:10.1371/journal.pone.0260135>
- 69 Zhang, L. *et al.* Role for the pleckstrin homology domain-containing protein CKIP-1 in AP-1 regulation and apoptosis. *EMBO J* **24**, 766-778 (2005). <https://doi.org:10.1038/sj.emboj.7600532>
- 70 De Francesco, P. N., Mucci, J. M., Ceci, R., Fossati, C. A. & Rozenfeld, P. A. Higher apoptotic state in Fabry disease peripheral blood mononuclear cells.: effect of globotriaosylceramide. *Mol Genet Metab* **104**, 319-324 (2011). <https://doi.org:10.1016/j.ymgme.2011.06.007>
- 71 Ko, Y. *et al.* Unravelling the mechanism of action of enzyme replacement therapy in Fabry disease. *J Hum Genet* **61**, 143-149 (2016). <https://doi.org:10.1038/jhg.2015.123>
- 72 Fall, B. *et al.* Urinary Podocyte Loss Is Increased in Patients with Fabry Disease and Correlates with Clinical Severity of Fabry Nephropathy. *PLoS One* **11**, e0168346 (2016). <https://doi.org:10.1371/journal.pone.0168346>
- 73 Chevrier, M. *et al.* Autophagosome maturation is impaired in Fabry disease. *Autophagy* **6**, 589-599 (2010). <https://doi.org:10.4161/auto.6.5.11943>
- 74 Liebau, M. C. *et al.* Dysregulated autophagy contributes to podocyte damage in Fabry's disease. *PLoS One* **8**, e63506 (2013). <https://doi.org:10.1371/journal.pone.0063506>
- 75 Jehn, U. *et al.* alpha-Galactosidase a Deficiency in Fabry Disease Leads to Extensive Dysregulated Cellular Signaling Pathways in Human Podocytes. *Int J Mol Sci* **22** (2021). <https://doi.org:10.3390/ijms222111339>
- 76 Roos, A. *et al.* Cellular signature of SIL1 depletion: disease pathogenesis due to alterations in protein composition beyond the ER machinery. *Mol. Neurobiol.* **53**, 5527-5541 (2016).
- 77 Clevers, H. & Nusse, R. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and disease. *Cell* **149**, 1192-1205 (2012).
- 78 Zhao, B., Tumaneng, K. & Guan, K.-L. The Hippo pathway in organ size control, tissue regeneration and stem cell self-renewal. *Nat. Cell Biol.* **13**, 877-883 (2011).
- 79 Couzens, A. L. *et al.* Protein interaction network of the mammalian Hippo pathway reveals mechanisms of kinase-phosphatase interactions. *Sci Signal* **6**, rs15 (2013). <https://doi.org:10.1126/scisignal.2004712>

- 80 Hwang, J. & Pallas, D. C. STRIPAK complexes: structure, biological function, and involvement in human diseases. *Int J Biochem Cell Biol* **47**, 118-148 (2014).  
<https://doi.org:10.1016/j.biocel.2013.11.021>
- 81 Siva Sankar, D., Hu, Z. & Dengjel, J. The complex interplay between ULK1 and protein phosphatases in autophagy regulation. *Autophagy* **18**, 455-456 (2022).  
<https://doi.org:10.1080/15548627.2021.2002546>
- 82 Jiang, L., Juan, L., Zhang, C., Shang, Y. & Lin, J. YAP-mediated crosstalk between the Wnt and Hippo signaling pathways (Review). *Molecular Medicine Reports* **22**, 4101-4106 (2020).  
<https://doi.org:10.3892/mmr.2020.11529>
- 83 Messelodi, D. *et al.* Neuronopathic Gaucher disease models reveal defects in cell growth promoted by Hippo pathway activation. *Commun Biol* **6**, 431 (2023).  
<https://doi.org:10.1038/s42003-023-04813-2>
- 84 Braun, F. *et al.* Accumulation of alpha-synuclein mediates podocyte injury in Fabry nephropathy. *J Clin Invest* **133**, doi:10.1172/JCI157782 (2023).

## Legend captions

Figure 1. Overview of the experimental design, data generation and data analysis.

Figure 2. Principal component analysis. A) Scores plot highlighting the differences the two groups. B) Loadings plot highlighting the top driving gene expression between the two groups. C) Spearman correlation heatmap of the top 20 differentially expressed genes.

Figure 3. A) Boxplots of the 20 top varying genes (upregulated and downregulated) between Fabry and control samples. Lines in the violin plots refer to quantiles (0.25, 0.50 and 0.75). B) Barplots of the change of the top genes and their functional classification.

Figure 4. Heatmap of the top reporter metabolites and their metabolic classes predicted by the metabolic modeling.

Figure 5. Summary of the biological and metabolic remodeling of Fabry podocytes

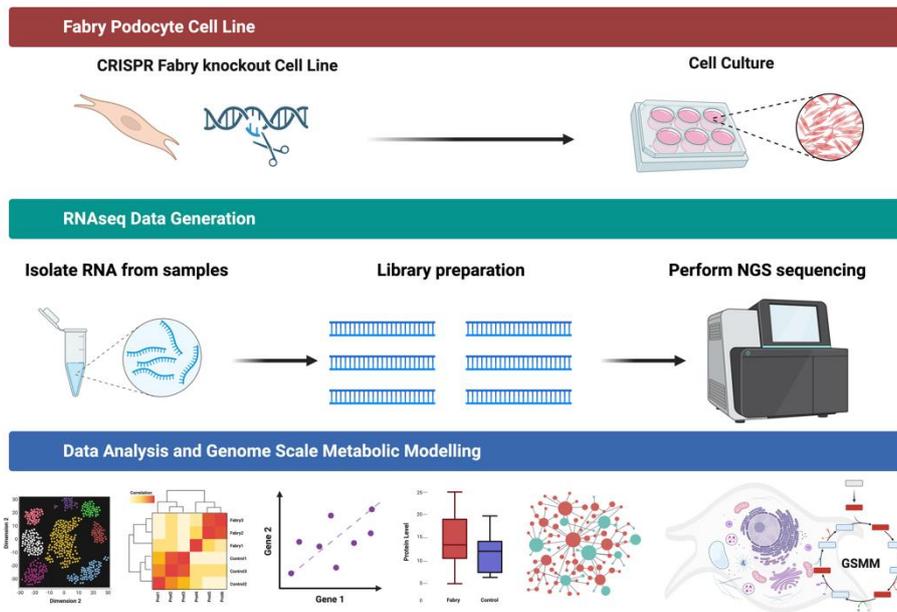


Figure 1. Overview of the experimental design, data generation, and data analysis.

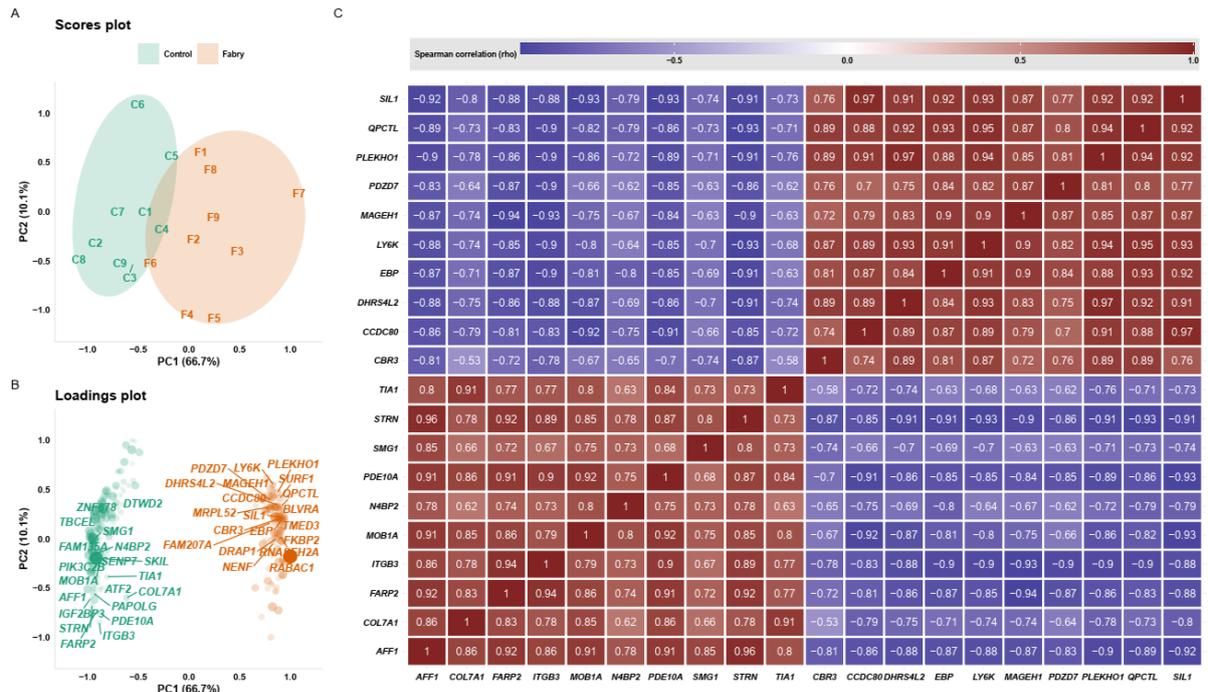


Figure 2. Principal component analysis. A) Scores plot highlighting the differences the two groups. B) Loadings plot highlighting the top driving gene expression between the two groups. C) Spearman correlation heatmap of the top 20 differentially expressed genes.

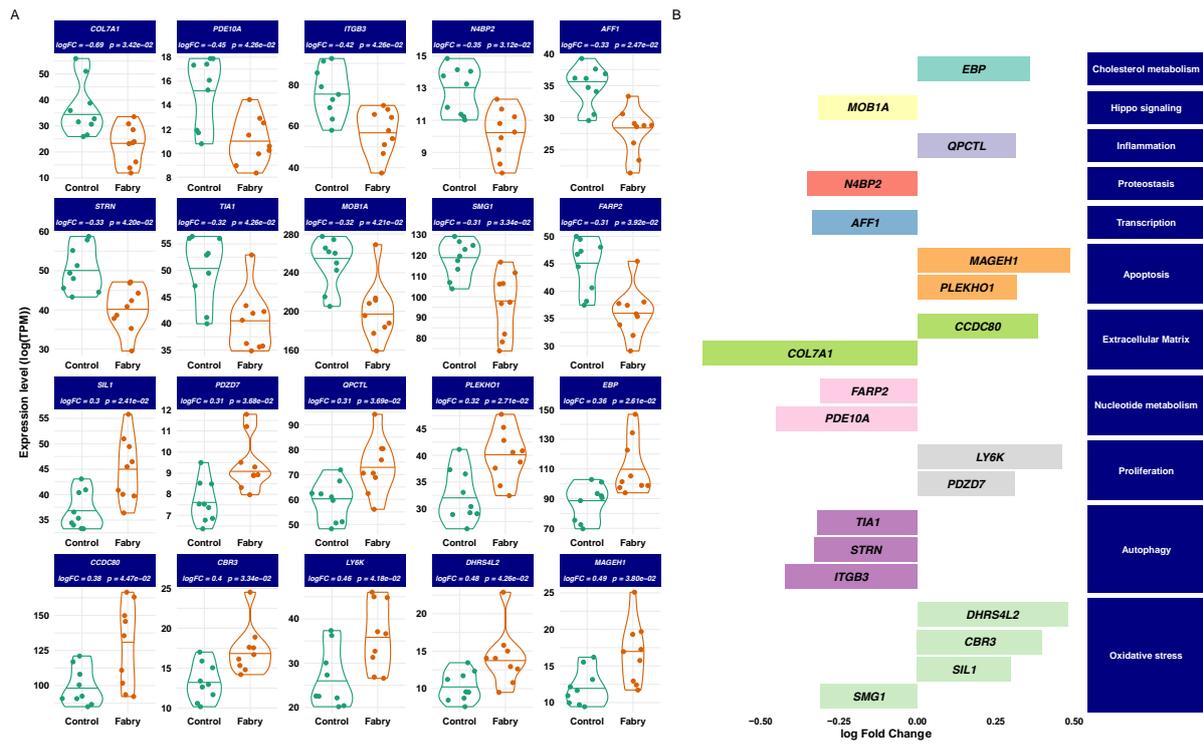


Figure 3. A) Boxplots of the 20 top varying genes (upregulated and downregulated) between Fabry and control samples. Lines in the violin plots refer to quantiles (0.25, 0.50 and 0.75). B) Barplots of the change of the top genes and their functional classification.

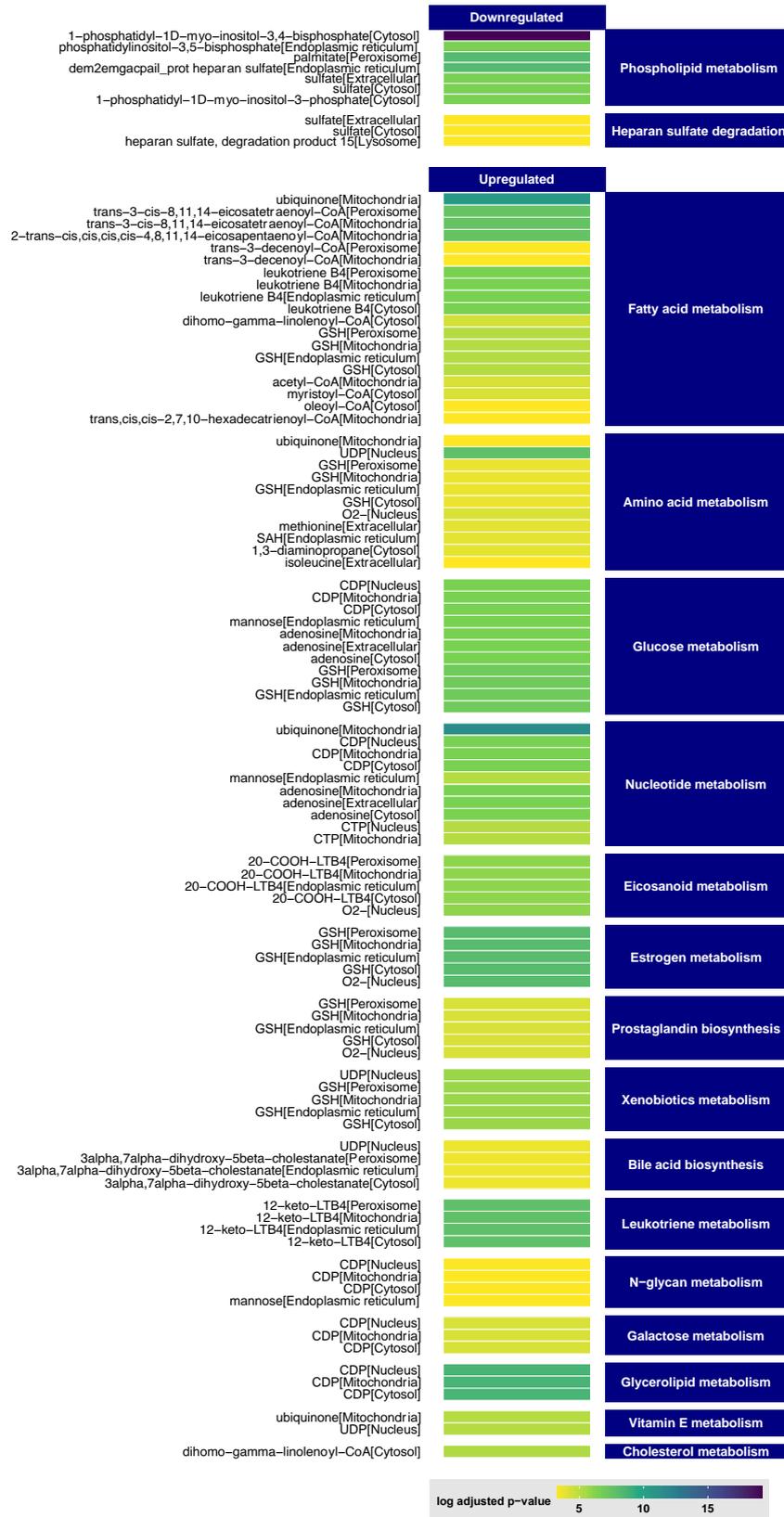


Figure 4. Heatmap of the top reporter metabolites and their metabolic classes predicted by the metabolic modeling.

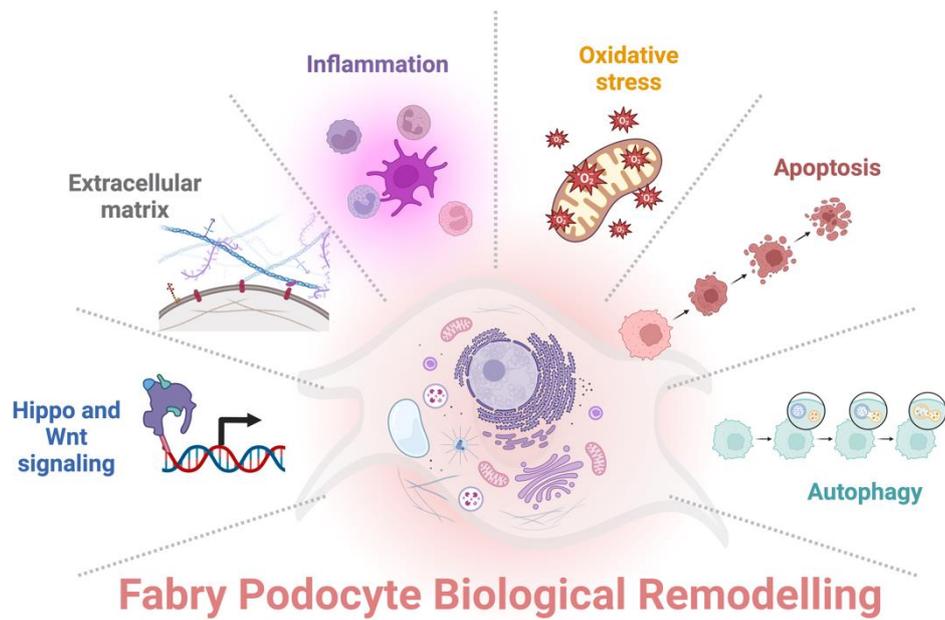


Figure 5. Summary of the biological and metabolic remodeling of Fabry podocytes.

## CHAPITRE II : « Exploring FGF2 and IL7 as potential biomarkers of Fabry disease »

### I. Contexte

La recherche de nouveaux biomarqueurs est très active dans la maladie de Fabry. Ces dernières années, les technologies omiques ont permis d'explorer de nouvelles voies afin de mieux comprendre la physiopathologie complexe de maladies telles que la maladie de Fabry, d'identifier de nouveaux biomarqueurs et des cibles thérapeutiques. Une approche protéomique ciblée par Tebani *et al.*<sup>288</sup> a mis en évidence deux protéines significativement augmentées dans les échantillons de plasma de patients Fabry par rapport à des plasmas de sujets sains et de patients atteints d'autres maladies lysosomales : l'interleukine 7 (IL-7) et le *fibroblast growth factor 2* (FGF2 ou bFGF).

Le FGF2 appartient à la grande famille des FGF<sup>645</sup>. Il est exprimé dans de nombreux de tissus, notamment dans le système nerveux central et le système musculo-squelettique. Ce facteur régule la différenciation cellulaire et la croissance des tissus au cours du développement et participe à l'homéostasie cellulaire. FGF2 se lie aux récepteurs du facteur de croissance des fibroblastes (FGFR) et intervient dans un large éventail de fonctions biologiques telles que l'angiogenèse, la prolifération cellulaire et la réparation tissulaire<sup>646</sup>. Une augmentation du FGF2 a déjà été décrite dans le rein d'un modèle murin de maladie de Fabry<sup>647</sup>. De plus, le traitement par Gb3 de cellules endothéliales en culture entraîne la surexpression de facteurs de croissance, notamment le FGF2<sup>647</sup>.

L'IL-7 est une cytokine pléiotrope non redondante nécessaire au développement des lymphocytes B et T<sup>648</sup>. Son expression est élevée dans les organes lymphoïdes mais est détectable dans de nombreux autres organes tels que les reins<sup>649</sup>. Des concentrations anormalement élevées ou non régulées d'IL-7 sont associées à une immunopathologie et soutiendraient une activité immunitaire aberrante dans les maladies inflammatoires chroniques<sup>650</sup>.

### II. Objectifs

Dans cette étude, nous cherchons tout d'abord à reproduire les résultats de Tebani *et al.* dans une cohorte indépendante de patients Fabry, puis à caractériser les effets du FGF2 et de l'IL-7 dans un modèle cellulaire de maladie de Fabry, des podocytes humains immortalisés modifiés par méthode

CRISPR-Cas9 et fournis par une équipe américaine<sup>560</sup>. L'objectif est de valider ces protéines en tant que nouveaux biomarqueurs potentiels.

### III. Résultats

Des échantillons de plasma de 56 patients Fabry provenant de la cohorte suisse (équipe du Dr Frédéric Barbey, Département d'Immunologie, Université de Lausanne et Centre Hospitalo-Universitaire de Lausanne) ont été analysés. Le dosage du FGF2 et de l'IL-7 a été effectué par une technique d'électrochimiluminescence, adaptée aux approches protéomiques ciblées. Les résultats ont été comparés aux données obtenues par Tebani *et al.*<sup>288</sup> dans des plasmas de patients d'une cohorte française (cohorte de découverte FFABRY) ainsi que dans des plasmas contrôles et des plasmas provenant de patients Gaucher, Pompe et Niemann-Pick de type C.

Les concentrations de FGF2 ne montrent pas de différence significative entre la cohorte de découverte (FFABRY) et la cohorte de validation (cohorte suisse). De plus, les cohortes de validation et de découverte montrent des concentrations significativement différentes du groupe témoin, des patients Pompe et des patients Gaucher.

Concernant les concentrations d'IL-7, les cohortes de validation et de découverte sont significativement différentes du groupe témoin. Il est à noter que les concentrations d'IL-7 sont plus faibles dans la cohorte de validation que dans la cohorte de découverte mais restent significativement plus élevées que dans le groupe Gaucher. De plus, les concentrations d'IL-7 sont augmentées dans le plasma des patients du groupe Pompe.

Le groupe de patients NPC était trop petit pour montrer des différences significatives.

Des données cliniques ont pu être obtenues récemment, et l'analyse des données au regard de ces métadonnées est en cours.

Afin de caractériser les effets de FGF2 et d'IL-7 sur des podocytes humains immortalisés Fabry et contrôles, quatre conditions ont été testées :

- Pré-traitement par FGF2 pendant 24 heures
- Pré-traitement par IL-7 pendant 24 heures
- Pré-traitement par FGF2 et IL-7 pendant 24 heures
- Incubation des cellules sans pré-traitement pendant 24 heures

Pour chaque condition, des cellules ont ensuite été incubées 72 heures supplémentaire soit avec ajout d'agalsidase- $\alpha$  dans le milieu de culture, soit sans traitement supplémentaire, puis centrifugées et congelées. Les analyses sur les premiers réplicas montraient un effet négatif potentiel du FGF2 et/ou de l'IL-7 sur l'accumulation de Gb3 dans les cellules Fabry traitées par agalsidase- $\alpha$ . Pour réaliser une étude métabolomique, nous avons donc réalisé des réplicas supplémentaires pour les conditions suivantes :

- Cellules contrôles non traitées
- Cellules Fabry traitées par agalsidase- $\alpha$  sans pré-traitement
- Cellules Fabry traitées par agalsidase- $\alpha$  pré-traitées par FGF2
- Cellules Fabry traitées par agalsidase- $\alpha$  pré-traitées par IL-7
- Cellules Fabry traitées par agalsidase- $\alpha$  pré-traitées par FGF2 et IL-7

Afin de caractériser l'effet du FGF2 et de l'IL-7 sur les cellules traitées par agalsidase- $\alpha$ , nous avons analysé par une approche métabolomique ciblée les culots cellulaires ainsi que le milieu de culture. Nous avons utilisé un kit commercial, le kit Absolute-IDQ P180 de Biocrates, permettant la mesure de 188 métabolites. Les analyses sur culots cellulaires ont identifié 54 métabolites différenciellement exprimés entre les différentes conditions. Les cellules témoins et les cellules Fabry traitées par agalsidase- $\alpha$  sans pré-traitement ont un profil métabolique similaire, avec seulement 10 métabolites différenciellement exprimés : six glycérophospholipides, trois acides aminés et un acylcarnitine. Le nombre de métabolites exprimés différenciellement augmente de manière significative lorsqu'un prétraitement est ajouté, avec notamment plusieurs sphingomyélines et un nombre plus élevé de glycérophospholipides exprimés différenciellement.

L'étude métabolomique des surnageants est en cours et apportera des informations précieuses sur les échanges entre le milieu intra- et extra-cellulaire. Les données brutes ont été acquises, un gros travail d'analyse est en cours.

Le dosage du lyso-Gb3 et l'analyse du marqueur de l'autophagie LC3-II par Western Blot sont prévus dans des culots cellulaires issus de cellules ayant subi différents traitements, afin de mieux appréhender la modulation par le FGF2 et l'IL-7 de l'effet du traitement par agalsidase- $\alpha$ . Les cultures cellulaires sont en cours. Les conditions expérimentales sont décrites dans le tableau ci-dessous. La bafilomycine, un inhibiteur de la V-ATPase, est utilisé comme contrôle positif.

Cellules	Pré-traitement (24h)	Traitement (72h)
Podocytes contrôles	0	0
	FGF2	0
	IL-7	0
	FGF2+IL-7	0
	0	$\alpha$ -GAL
	FGF2	$\alpha$ -GAL
	IL-7	$\alpha$ -GAL
	FGF2+IL-7	$\alpha$ -GAL
	Bafilomycine	
Podocytes Fabry	0	0
	FGF2	0
	IL-7	0
	FGF2+IL-7	0
	0	$\alpha$ -GAL
	FGF2	$\alpha$ -GAL
	IL-7	$\alpha$ -GAL
	FGF2+IL-7	$\alpha$ -GAL
	Bafilomycine	

Sur la base de ces résultats, nous avons rédigé un article qui sera complété une fois l'analyse des données cliniques et des données de métabolomique dans les surnageants et les dosages dans les culots cellulaires effectués.

#### IV. Conclusion

La maladie de Fabry est une maladie héréditaire du métabolisme rare avec un large spectre clinique et une morbidité élevée, ne disposant que d'un seul biomarqueur spécifique avec une efficacité partielle. Nous avons confirmé dans une cohorte indépendante de 56 patients Fabry suisses l'élévation des concentrations plasmatiques de FGF2 et d'IL-7 qui avait été mise en évidence par une approche

protéomique par Tebani *et al.* 2020<sup>288</sup>. Des analyses plus approfondies sont en cours afin d'évaluer la variation de ces biomarqueurs en fonction des données cliniques et biologiques des patients.

Afin de caractériser l'effet d'une élévation de FGF2 et/ou d'IL-7, nous avons choisi un modèle cellulaire de maladie de Fabry, des podocytes humains. En effet, le rein est l'un des principaux organes cibles de cette maladie multisystémique, avec des lésions précoces des podocytes. Nous avons mis en évidence une modification du profil métabolique des cellules Fabry traitées par enzymothérapie substitutive lors de l'ajout de ces deux protéines. Les métabolites différentiellement exprimés étaient principalement des sphingomyélines et des glycérophospholipides, en particulier des phosphatidylcholines. Ces deux classes de lipides jouent un rôle structural dans la cellule, participent à la transmission du signal et sont impliquées dans de multiples processus biologiques, tels que l'inflammation et la différenciation cellulaire<sup>651</sup>. Ces modifications reflètent une altération substantielle de la composition des membranes lipidiques dans la maladie de Fabry.

L'identification de nouveaux biomarqueurs spécifiques de la maladie de Fabry par une approche protéomique et leur validation dans une cohorte indépendante ouvrent la voie à une éventuelle application clinique. Ces protéines constituent une piste sérieuse dans la recherche de nouveaux biomarqueurs spécifiques de la maladie de Fabry. Un profil métabolique spécifique aux plasmas de patients Fabry par rapport à des plasmas contrôle a été rapporté par Ducatez *et al.*<sup>625</sup>. L'utilisation de profils élargis de biomarqueurs incluant des protéines et métabolites permettrait de tirer parti de tout le potentiel des approches omiques.

L'implication de l'IL-7 et du FGF2 dans l'immunopathologie, l'inflammation, l'angiogenèse, la fibrose et la perturbation de l'autophagie, font également de ces protéines des cibles thérapeutiques potentielles.



# Exploring FGF2 and IL7 as potential biomarkers of Fabry disease

Sarah Snanoudj<sup>1#</sup>, Frédéric Barbey<sup>2#</sup>, Agnès Boullier<sup>3</sup>, Céline Lesueur<sup>1</sup>, Carine Pilon<sup>1</sup>, Thomas Plichet<sup>1</sup>, Esther Noel<sup>4</sup>, Régine Perrichot<sup>5</sup>, Fabien Labombarda<sup>6</sup>, Alexandre Nguyen<sup>7</sup>, Stéphane Marret<sup>8</sup>, Soumeya Bekri<sup>1</sup>, Abdellah Tebani<sup>1\*</sup>

## Affiliations

- <sup>1</sup> Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM U1245, CHU Rouen, Department of Metabolic Biochemistry, 76000 Rouen, France; [sarah.snanoudj@chu-rouen.fr](mailto:sarah.snanoudj@chu-rouen.fr) (S.S.); [celine.lesueur@chu-rouen.fr](mailto:celine.lesueur@chu-rouen.fr) (C.L.); [carine.pilon@chu-rouen.fr](mailto:carine.pilon@chu-rouen.fr) (C.P.); [thomas.plichet@chu-rouen.fr](mailto:thomas.plichet@chu-rouen.fr) (T.P.); [soumeya.bekri@chu-rouen.fr](mailto:soumeya.bekri@chu-rouen.fr) (S.B.); [abdellah.tebani@chu-rouen.fr](mailto:abdellah.tebani@chu-rouen.fr) (A.T.)
- <sup>2</sup> University of Lausanne and University Hospital of Lausanne, Department of Immunology, CH-1011 Lausanne, Switzerland; [frederic.barbey@chuv.ch](mailto:frederic.barbey@chuv.ch) (F.B.)
- <sup>3</sup> UR 7517 UPJV, Pathophysiological Mechanisms and Consequences of Cardiovascular Calcifications (MP3CV), Picardie Jules Verne University, 80025 Amiens, France & Amiens-Picardie University Medical Center, Human Biology Center, 80054 Amiens, France; [boullier.agnes@chu-amiens.fr](mailto:boullier.agnes@chu-amiens.fr) (A.B.)
- <sup>4</sup> Department of Internal Medicine, Strasbourg University Hospital, 67091 Strasbourg, France; [esther.noel@chru-strasbourg.fr](mailto:esther.noel@chru-strasbourg.fr) (E.N.)
- <sup>5</sup> Nephrology Department, Vannes Hospital, 56000 Vannes, France; [regine.perrichot@ch-bretagne-atlantique.fr](mailto:regine.perrichot@ch-bretagne-atlantique.fr) (R.P.)
- <sup>6</sup> Department of Cardiology, Caen University Hospital, Caen-Normandy University, 14000 Caen, France; [labombarda-f@chu-caen.fr](mailto:labombarda-f@chu-caen.fr) (F.L.)
- <sup>7</sup> Department of Internal Medicine, Caen University Hospital, Caen-Normandy University, 14000 Caen, France; [nguyen-a@chu-caen.fr](mailto:nguyen-a@chu-caen.fr) (A.N.)
- <sup>8</sup> Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM U1245, CHU Rouen, Department of Neonatal Pediatrics, Intensive Care, and Neuropediatrics, 76000 Rouen, France; [stephane.marret@chu-rouen.fr](mailto:stephane.marret@chu-rouen.fr) (S.M.)

# These authors contributed equally to this work

\* Correspondence

Dr. Abdellah TEBANI

Department of Metabolic Biochemistry,

Rouen University Hospital

76000 Rouen Cedex

France

[abdellah.tebani@chu-rouen.fr](mailto:abdellah.tebani@chu-rouen.fr)

## Introduction

Glycosphingolipids are an abundant subtype of cell membrane lipids<sup>1</sup>. Their degradation requires several steps and the coordinated activity of different lysosomal hydrolyzing enzymes. Deficiency in alpha-galactosidase A ( $\alpha$ -D-galactoside galactohydrolase, EC 3.2.1.22;  $\alpha$ -GAL A) which predominantly hydrolyzes ceramide trihexosides<sup>2,3</sup> results in Fabry disease (FD, OMIM 301500), a rare X-linked lysosomal disease (LD).  $\alpha$ -GAL A is encoded by the *GLA* gene, with about 1,000 variants recorded in the Human Gene Mutation Database.

FD is a multisystemic disorder with a wide array of symptoms, age of onset, and severity<sup>4</sup>. Symptoms include neuralgic pain, *cornea verticillata*, angiokeratomas, gastrointestinal involvement, abnormal sweating, hearing loss, hypertrophic cardiomyopathy, arrhythmia, progressive renal failure, cerebral white matter lesions, and stroke. Clinical presentations range from a “classical” phenotype with onset of symptoms and complications as early as infancy<sup>5,6</sup> to single organ injury in adulthood in “non-classical” form. Because of the X-linked inheritance pattern of the disease, females generally have a less severe presentation of the disease, or can be asymptomatic<sup>7</sup>. Progressive end-organ damages can lead to life-threatening complications.

The prevalence of FD varies between 1/40,000 and 1/117,000 in Europe but recent newborn screening programs suggest that it could be underestimated, due to the broad spectrum of clinical phenotypes<sup>8-11</sup>. FD diagnosis relies on leukocyte<sup>12</sup> or dried blood spot (DBS)<sup>13</sup>  $\alpha$ -GAL A enzyme activity measurement in male patients, and analysis of *GLA* gene in females and for confirmation in males<sup>14</sup>.

FD results in the accumulation of globotriaosylceramide (Gb3 or GL3), which was historically used as a disease biomarker. However, the use of Gb3 was discontinued, as its deacylated form, lysoGb3 (also known as lyso-GL3 or globotriaosylsphingosine), proved to be a more reliable biomarker<sup>15</sup>. The use of plasma and/or DBS lyso-Gb3 is recommended in the diagnosis and follow-up of patients with classic FD, regardless the age and sex of the patient. When increased, it can also be useful in the diagnosis of patients with a later onset who have higher residual  $\alpha$ -GAL activity, and disease manifestations that may be limited to a single organ<sup>16</sup>, and can help determining the pathogenicity of a *GLA* variant<sup>17</sup>. The severity of the disease has been shown to be inversely linked to plasma lyso-Gb3 level<sup>18,19</sup>. However, lyso-Gb3 increase may be lacking in female patients and in patients with a non-classical disease<sup>20</sup>. It is routinely used in male patients with classic FD for monitoring initial treatment response but it has been established that it does not correlate well with disease progression or prognosis in patients who have received treatment and has not been validated for therapy monitoring<sup>21</sup>. Disease monitoring requires the use of complementary organ-specific biomarkers and lyso-Gb3 is the sole specific biomarker currently available<sup>22</sup>. Consequently, new specific biomarkers are needed to stratify and monitor Fabry patients more effectively.

Two specific therapeutic approaches are available: Intravenous enzyme replacement therapy (ERT) with human  $\alpha$ -GAL A<sup>23</sup> and oral chaperone therapy<sup>24</sup>, suitable only for patients carrying amenable *GLA* variants. Both approaches aim to reduce substrate accumulation.

Generally, the lysosome is considered as an organelle with mainly a breakdown function, and is thought of as the recycling plant of the cell. However, recent discoveries have put the lysosome back at the heart of cellular metabolism, making it an authentic dynamic metabolic hub indispensable to the cell's homeostasis. Thus, lysosomal protein deficiencies result in substrate accumulation, but also prominently in the disruption of a large number of metabolic pathways<sup>25</sup>, such as autophagy impairment<sup>26</sup> and inflammation<sup>27</sup>, better accounting for the

complexity of lysosomal disease pathophysiology. To further understand the complex pathogenesis of disorders such as FD<sup>28</sup>, omics sciences have been an invaluable tool in recent years, allowing to explore as yet unknown avenues. A targeted proteomic approach by Tebani *et al.*<sup>29</sup> in the plasma of Fabry patients yielded two discriminant proteins, fibroblast growth factor 2 (FGF2 or bFGF for basic fibroblast growth factor) and interleukin 7 (IL-7). Both proteins were significantly increased in FD plasma samples compared to healthy controls and to plasma samples from patients with other lysosomal disorders.

The fibroblast growth factor 2 (FGF2) belongs to the large FGF family<sup>30</sup>. FGF2 is expressed in a number of tissues, including the central nervous and the musculoskeletal systems. It regulates cell differentiation and tissue growth during development and is involved in cell homeostasis. FGF2 binds to fibroblast growth factor receptors (FGFR) and mediates a wide range of biological functions such as angiogenesis, cell proliferation, and tissue repair<sup>31</sup>. FGF2 has previously been reported as increased in the kidney of FD murine model<sup>32</sup>. Furthermore, Gb3 treatment of cultured endothelial cells resulted in the overexpression of growth factors, including FGF2<sup>32</sup>.

Interleukine 7 (IL-7) is a pleiotropic non-redundant cytokine necessary for the development of B and T lymphocytes<sup>33</sup>. Its expression is high in lymphoid organs but is detectable in numerous organs such as intestine<sup>34,35</sup>, liver, kidney<sup>36</sup>, and skin<sup>37</sup>, with both epithelial and endothelial cells as sources<sup>38</sup>. Abnormally high or unregulated levels of IL-7 associate with immunopathology<sup>39</sup> and is thought to support aberrant immune activity in chronic inflammatory diseases. Vps34, the class III PI3K, which plays a critical role in the initiation of autophagy<sup>40</sup>, regulates an IL-7 mediated pathway<sup>41</sup>.

In this study, we aim to replicate Tebani *et al.* findings in an independent cohort, and to characterize the effects of FGF2 and IL-7 in a Fabry human podocytes model in order to validate these proteins as new potential biomarkers.

## Materiel and methods

### *Patients and blood samples*

Blood samples were collected from patients with a confirmed Fabry diagnosis from Switzerland (Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, Lausanne). A summary overview of the clinical characteristics, phenotype, treatment, laboratory investigations, and *GLA* genotype of Fabry patients is presented in **Supplementary Table S1**. Fifty-six patients were included: 33 with classical phenotype including 20 females (age range: from 20.1 to 83 years, mean age: 45.9 years) and 13 males (age range: from 12.2 to 66.5 years, mean age: 41.6 years), 21 with non-classic phenotype including 14 females (age range: 25 to 66 years, mean age: 43.1 years) and seven males (age range: 21.3 to 73 years, mean age: 44 years). Twenty-eight were treated, 26 with ERT (21 classical and five non-classical), two with Migalastat (non-classical). Genotype is known in 51 patients out of 56. Human controls were selected with similar mean age and sex with no significant medical conditions. Control plasmas were purchased from Biovit (West Sussex, UK). Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

### *Determination of plasma IL-7 and FGF2 concentrations*

IL-7 and bFGF concentrations were measured in plasma using V-PLEX electrochemiluminescent immunoassay platform (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD, United States).

Plasma samples (1:2 dilution) or calibrator were loaded onto a V-PLEX Plus Human bFGF plate and a V-PLEX Plus Cytokine Panel 1 (human) plate only partially coated to measure hu IL-7. Assays were performed per the manufacturer's protocol. Briefly, for the measure of bFGF, 150  $\mu$ L of blocker A (bovine serum albumin, phosphate buffered solution with surfactant) were distributed into each well of the bFGF plate and incubated for 1 h with vigorous shaking at room temperature. The blocker was discarded and the plate was washed three times with phosphate buffered saline (Meso Scale Discovery). Fifty microliters of 1:2 diluted plasma samples and calibrators were dispensed into separate wells of the plates and incubated for 2 h with vigorous shaking at room temperature. The samples and calibrators were discarded and the plates were washed three times with phosphate buffered saline (Meso Scale Discovery) followed by an addition of 25  $\mu$ L of the 1X Detection Antibody Solution (Meso Scale Discovery) into each well. Plates were then incubated for 2 h with vigorous shaking at room temperature. The detection antibody was removed, and the plates were washed three times. One hundred and fifty microliters of 2X Read Buffer T (Meso Scale Discovery) were added to each well.

Plates were read on a Quickplex SQ 120 Imager (Meso Scale Discovery). Standard curves were generated and the assay values of the samples were interpolated from the curves using the MSD Discovery Workbench.

### *Lyso-Gb3 in plasma*

Lyso-Gb3 concentrations were measured by a multiplex method previously described by Polo et al.<sup>42</sup>.

### *Cell cultures and treatments*

Our study used human immortalized podocytes that were kindly provided by Dr. Weisz's team<sup>43</sup>.

Two types of cells were used: control podocytes, and Fabry podocytes obtained by CRISPR/Cas9 technology. The cells were incubated at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> in Dulbecco's modified Eagles Medium: Nutrient Mixture F-12 or DMEM/F-12 (P04-41450, PAN BIOTECH, Germany) supplemented with 10% fetal bovine serum – FBS (CVFSVF00-01, Eurobio Scientific, Les Ulis, France), 1% glutamine 200nM (CSTGLU00-0U, Eurobio Scientific), 1% penicillin 100 UI/ml and streptomycin 100  $\mu$ g/ml (P0781, Sigma-Aldrich, MO, USA), and 0.1% ITS cell culture supplement (P07-03110, PAN BIOTECH). Medium was exchanged every 2 to 3 days.

Cells were detached using trypsin which was deactivated using culture medium. Cells were then transferred to new cell culture dishes at a density of 10,000 per cm<sup>2</sup>. After 24 hours, the medium was changed and 10 ng/mL of recombinant human IL-7 protein (207-IL, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) and/or recombinant human FGF basic protein (233-FB, R&D Systems) were added to the medium when indicated. After 24 hours, 5  $\mu$ L/mL of human alpha-galactosidase A (agalsidase alfa, REPLAGAL 1mg/ml, Takeda Pharmaceuticals, Tokyo, Japan) was added. Cells were further incubated for 72 hours and then pelleted. Cell pellets and supernatants were frozen at -80°C. HPLC Plus grade water was added and the cell pellets were sonicated for further analysis.

### *Gb3 assessment using mass spectrometry*

Gb3 measurement was implemented according to Mills' method<sup>44</sup>. Cultured cells were scraped with phosphate-buffered saline (PBS) and centrifuged 10 minutes at 2000 rounds per minute. The pellet was hydrated using 500 µl of water (Water Plus, Carlo Erba) and mixed using ultrasonic sound 5 times for 2 seconds. Three hundred µL of this mix were added to 300 µl of water (Water Plus, Carlo Erba) and 50 µl of C17-CTH (Matreya) at 0.05 µg/ml used as calibrator. A sample of 100µl was used for protein assessment. Extraction was realized with the addition of 5 mL of chloroform (Merck) : methanol (Carlo Erba) (2 :1, v/v) by shaking on multivortexer for 10 minutes. The two layers were separated by centrifugation for 5 minutes at 3500 rounds per minute. The higher layer was transferred to a new vial and dried under N<sub>2</sub> at 40°C. Prior to mass spectrometer analysis, 100µl of methanol were added. Gb3 quantitative analysis was performed with the mass spectrometer Sciex 4000 QTRAP (AB Sciex) using the electrospray ion source (TurboIonSpray). Ten microliters were directly infused into the electrospray via HPLC line (Shimadzu) in FIA mode (flow injection analysis).

### *Protein concentration*

Protein concentration was determined by colorimetric assay on a COBAS 8000 module (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland).

### *LC3 analysis by Western Blot*

The method was previously described by Chevrier *et al.*<sup>26</sup>. Briefly, podocyte pellets were washed twice with PBS and protein was extracted with lysis buffer from the NucleoSpin® RNA/Protein kit (Macherey-Nagel, 740933). Fifty µg of protein from podocyte samples were analyzed by SDS-PAGE 15% under reducing conditions and transferred to a PVDF membrane. The membrane was then blocked with 1X TBS, 0.5% tween-20, and 5% nonfat milk and incubated with the mouse monoclonal anti-LC3 antibody (Nanotools, 0231). Enhanced chemiluminescence reagent ECL (GE Healthcare Limited, RPN 2133) was used for protein detection with HRP-conjugated anti-mouse (Santa Cruz, SC 2031). For normalization, membrane was dehybridized by incubating the membrane 30 min at 50°C in a dehybridization solution (Tris-HCL 0.5 M pH 6.8, SDS 10%, mercaptoethanol 7 mM) and incubated with mouse monoclonal anti-β-actin antibody (Sigma-Aldrich, A5441). Image quantification was performed using Quantity one and Gel doc XR from Biorad (Hercules).

### *Targeted metabolomic analysis*

The Biocrates Absolute-IDQ P180 kit (Life Science AG, Innsbruck, Austria) was used to perform targeted metabolomic analysis on cell pellets and culture media. The kit is a fully automated assay based on phenylisothiocyanate (PITC) derivatization of the target analytes in bodily fluids using internal standards for quantitation allowing the quantification of 188 metabolites. The full list of measured metabolites is presented **Supplementary Table S2**. All reagents, internal and calibration standards, quality controls, test mix, and a patented 96-well filter plate were included in the kit or provided by Biocrates Life Science AG. The manufacturer's protocol was followed throughout sample preparation<sup>45,46</sup>. In brief, 10 µL of centrifuged culture media or sonicated cell pellets were transferred to the upper 96-well plate and dried under a nitrogen stream. The derivatization of amino acids and biogenic amines was

then completed by adding 50  $\mu$ L of a 5% PITC solution. After incubation, the spots were once more dried, and the metabolites were extracted into the lower 96-well plate for analysis after being further diluted with the MS running solvent A using 5 mM ammonium acetate in methanol (300  $\mu$ L). Isotopically labeled internal standards with a calibration curve were used for quantification. Three concentrations of quality controls included in the kit were used as part of the quality control process. 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 carried out in accordance with the kit manufacturer's instructions: autosampler temperature at 10 °C, injection volume at 10  $\mu$ L, reversed-phase HPLC gradient using HPLC grade water and acetonitrile, both with 0.2% formic acid (FA), with a flow rate of 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. A 4000 Qtrap mass spectrometer (Sciex, Framingham, MA, USA) with an electrospray ion source was used, coupled with the liquid chromatography (LC) instrument prominence Shimadzu UFLC System (Shimadzu, Prominence, Kyoto, Japan). The Analyst 1.5 software (Sciex) was used for data acquisition and processing. Further analysis and quality control process for the profiling was completed using the MetIDQ software (Biocrates).

### Data analysis

A Shapiro-Wilk test was used to assess normality. To evaluate the differences between groups, we used the Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance (ANOVA) on Ranks and Dunn's tests. A significance level was set to 0.05. GraphPad and R software were used for data analysis and visualization.

## Results

This work first aims to validate the specific increase of IL-7 of FGF2 in the plasma of Fabry patients. A hundred and five plasma samples were obtained from patients from Switzerland. IL-7 and FGF2 concentrations were measured in all 56 plasmas and compared to the results obtained by Tebani *et al.* An overview of the validation cohort is presented in **Figure 1** and metadata is available in the supplementary data (**Supplementary Table S1**).

For FGF2 concentrations, there was no significant difference between the discovery cohort and the validation cohort. Meanwhile, both validation and discovery cohorts were significantly different from the control group ( $p < 0.001$ ), Pompe patients ( $p < 0.001$ ) and Gaucher patients ( $p < 0.001$  for the discovery cohort,  $p < 0.05$  for the validation cohort).

For IL-7 concentrations, both validation and discovery cohorts were significantly different from the control group ( $p < 0.001$ ). IL-7 concentrations were lower in the validation cohort than in the discovery cohort. They were however still significantly increased compared to Gaucher patients ( $p < 0.05$ ).

The NPC patients' group was too small to show significant differences.

Results are presented in **Figure 2** and the full data is provided in **Supplementary Table S3**.

To further characterize these potential biomarkers and their significance in the pathophysiology of Fabry disease, we performed functional analyses on a cell model of Fabry disease, human immortalized podocytes without  $\alpha$ -GAL activity, compared to control human immortalized podocytes. We pre-treated the cells with either human IL-7 protein, human FGF2 protein, both

or neither. Half of the cells were then treated by agalsidase alfa. The experimental overview is shown in **Figure 3**.

First three exploratory replicates in each condition showed a potential negative effect of IL-7 and/or FGF2 on Gb3 accumulation (**Figure 4**). Based on these results, nine further replicates were performed for untreated control cells without pre-treatment and treated Fabry cells with all four pre-treatment conditions (IL-7, FGF2, IL-7 and FGF2, and no pre-treatment), and targeted metabolic analysis was performed on the cell pellets and the culture medium.

Fifty-four metabolites were identified as differentially expressed between the different conditions in the cell pellets (**Figures 5 and 6, Supplementary Table S4 and S5, Supplementary Figure S1**). This included 11 sphingomyelins, 28 glycerophospholipids, four acylcarnitines, four biogenic amines, and seven amino acids.

Only six glycerophospholipids, three amino acids and one acylcarnitine were differentially expressed between the control cells and the agalsidase alfa-treated Fabry cells without pre-treatment. All 10 metabolites had a lower expression in agalsidase alfa-treated Fabry cells compared to control cells with three glycerophospholipids being the most differentially expressed ( $p < 0.001$ ): PC ae 30:1, PC aa 42:5, and PC aa 42:4.

The number of metabolites differentially expressed rises significantly when pre-treatment is added, as can be visualized in **Figure 5**, with notably multiple sphingomyelins and a higher number of glycerophospholipids differentially expressed. All differentially expressed sphingomyelins had a higher expression in IL-7- and/or FGF2-treated Fabry cells compared to control cells or to only agalsidase alfa-treated Fabry cells. Monounsaturated glycerophospholipids were predominantly underexpressed in IL-7- and/or FGF2-treated Fabry cells compared to the other conditions whereas polyunsaturated glycerophospholipids were generally overexpressed.

## Discussion

This project consists in characterizing two proteins, IL7 and FGF2, as potential biomarkers of FD. As an increase in the plasma concentration of these proteins had been reported by our team in a French cohort of Fabry patients<sup>47</sup>, this work aims to confirm these data on an independent cohort and to study the effect of these biomarkers on the ERT response using cultured podocytes.

FGF2 has pleiotropic roles in several cell types and tissues; it is an angiogenic and survival factor which is involved in cell proliferation, differentiation, and migration, as well as a variety of developmental processes<sup>48</sup>. Interestingly, FGF2 has been implicated in podocyte injury. It has been shown to be involved in the formation of adhesive lesions<sup>49</sup>, to cause significant changes in podocyte morphology and gene expressions in a dose-dependent manner and to enhance podocyte motility<sup>50</sup>. It also induces imbalance between proteinases and their inhibitors, resulting in the degradation of the glomerular basement membrane and increased glomerular permeability<sup>51</sup>.

FGF2 is also involved in epithelial–mesenchymal transition (EMT), an important biological process contributing to kidney fibrosis and chronic kidney disease<sup>52</sup>. It is implicated in the TGF- $\beta$ /CSTF2/FGF2 profibrotic axis<sup>53</sup>. TGF- $\beta$  being a cytokine expressed in human renal tissue of Fabry patients and associated with Fabry nephropathy<sup>32,54</sup>. The Wnt/ $\beta$ -catenin pathway, a complex signaling network known to regulate cellular homeostasis in adult tissues, including the kidney, also contributes to kidney fibrosis and podocyte injury, resulting in proteinuria<sup>55,56</sup>. Moreover, a transcriptomic approach in human Fabry podocytes showed differentially

expressed genes compared to control cells of genes belonging to the Wnt pathway (Snanoudj *et al.*, *submission pending*).

IL-7 is a cytokine involved in chronic inflammation, mediating both humoral and cellular responses<sup>57</sup>. Abnormally high or unregulated levels of IL-7 and IL-7R, its receptor, are associated with immunopathology and are thought to support aberrant immune activity in autoimmune<sup>58</sup> and chronic inflammatory diseases<sup>59,60</sup>. It is a circulating inflammatory marker in vascular dysfunction<sup>61</sup>, a hallmark of Fabry disease.

IL-7 has been described to inhibit autophagy by regulating AMPK/mTOR signaling<sup>62,63</sup> and overexpression of IL-7 could participate in autophagy impairment described in Fabry disease<sup>26</sup>.

Upregulation of IL-7R has been reported in the glomeruli of a mouse model of nephropathy. IL-7R stimulation by IL-7 in podocytes leads to impaired filtration barrier function of podocytes and podocyte injury by promoting apoptosis, suppressing nephrin activation, and disorganizing the actin cytoskeleton<sup>64</sup>, although underlying mechanisms are poorly understood.

FGF2 and IL-7 could represent new therapeutic targets and anti-FGF2 molecules such as anti-FGF2 aptamer<sup>65</sup> and anti-IL-7R antibodies could potentially alleviate disease progression under ERT or chaperone treatment.

The first part of this work enabled us to confirm in an independent cohort of 56 Swiss Fabry patients the elevation of FGF2 and IL-7 plasma concentrations that was unveiled by Tebani *et al.*<sup>29</sup>. The validation cohort presented some differences with the discovery cohort however, with a higher percentage of women, of non-classic phenotype and of non-treated patients compared to the discovery cohort. Concentrations of FGF2 were comparable in both cohorts whereas IL-7 concentrations were lower in the validation cohort compared to the discovery cohort, albeit significantly higher than in the control and the Gaucher groups. This could be due to a difference in sample conservation or in the cohort characteristics, hinting to a possible prognostic value of IL-7.

To then characterize the impact of a high concentration of FGF2 and IL-7 on ERT response, we used a targeted metabolomic approach in a cellular model of Fabry disease. Given that both proteins have an impact on renal pathology and that the podocyte is a key cell in Fabry disease with early involvement, Fabry and control human podocyte cell lines were used.

Control cells and ERT treated Fabry had a close metabolic signature with only ten differentially expressed metabolite. When the ERT Fabry cells are treated with FGF2 and/or IL-7, we observe an increase in sphingomyelins and phosphatidylcholines concentrations. Both classes of lipids have a structural role in the cell, participate in signal transmission, and are involved in multiple biological processes, such as inflammation and cell differentiation<sup>66</sup>. No additive effect of FGF2 and IL-7 was observed.

Sphingomyelins are a subclass of sphingolipids composed of a sphingosine backbone (an amino alcohol), a fatty acid chain attached to the amino group of a sphingosine, a phosphate group, and a polar head group (such as choline) attached to the phosphate. They are particularly abundant in the myelin sheath but are the most abundant sphingolipid in the cell and is a main component of the plasma membrane<sup>67</sup>. The membrane lipid composition is substantially altered in Fabry disease. Major consequences of these alterations are marked effects on the trafficking and sorting of membranes-associated proteins that could lead to altered signaling at the cell surface with implications on gene regulation and subsequent protein expression<sup>68</sup>. Urinary lipid profiling of Fabry hemizygotes has shown an increase in lactosylceramide and ceramide along with decreased concentrations of glucosylceramide and

some sphingomyelins, most likely reflecting perturbed intracellular transport of lipids in renal epithelial cells<sup>69</sup>.

Phosphatidylcholines are a type of glycerophospholipids. Glycerophospholipids are amphipathic molecules composed a glycerol backbone, two fatty acid chains (acyl chains) attached to the first and second carbons of the glycerol, a phosphate group attached to the third carbon, and a polar head group (a choline in the case of phosphatidylcholines) attached to the phosphate group. They are found in all cellular membranes, including the mitochondria, plasma membrane, and lysosome, and are asymmetrically distributed between the two bilayers<sup>70</sup>. They constitute the backbone of cellular membranes and play a role in membrane fluidity and ion permeability. They also participate in signaling pathways with the liberation of second messenger arachidonic acid by phospholipase A2 that notably modulates podocyte function<sup>71</sup>.

Lipid composition affects the biophysical properties of membranes, which are key for receptor-mediated cellular signaling and innate immune responses modulation, with a circular network of coregulated sphingolipids and glycerophospholipids<sup>72</sup>. Occurrence of cross talk between glycerophospholipid and sphingomyelin signaling pathways is described and this controlled and coordinated signaling may be involved in cell proliferation, differentiation, and apoptosis<sup>73</sup>.

Sphingolipids and glycerophospholipids are components of the lipid rafts (LRs) in plasma membranes. LR are distinct, ordered, liquid domains enriched in sphingolipids and cholesterol segregated from less ordered membrane domains composed of mainly unsaturated phospholipids. The function of LR depends on their lipid membrane composition. There is increasing evidence for a regulatory role of LR particularly in signaling and trafficking pathways<sup>74,75</sup>. Lipid rafts are notably important for proper function of podocytes, a key element of the glomerular filtration barrier<sup>76</sup>. In Fabry disease, the increase in Gb3 was associated with a decrease in the molar ratio of cholesterol, suggesting that  $\alpha$ -GAL A deficiency could alter the membrane composition and structure within the lipid raft domains<sup>77</sup>. The alterations in lipid raft composition induce changes in lipid raft dynamics that may occur upon activation/oligomerization of raft-associated proteins which could impact raft-mediated signal transduction<sup>78</sup>. Alterations in lipid composition has also been described in high-density lipoprotein (HDL) particles in patients with chronic kidney disease, with dysfunctional HDLs compared with the general population lacking the typical anti-inflammatory and cholesterol efflux capabilities. Whole-plasma lipidomics has shown specific alterations in the lipid composition of HDL, notably in sphingomyelins and phosphatidylcholines content<sup>79</sup>.

The kidney is one of the most affected organs in Fabry disease and end-stage renal disease is a significant cause of morbidity in these patients<sup>80</sup>. While advanced stages of chronic renal disease usually develop in middle adulthood in males, the first histological signs of kidney involvement are seen as early as in utero<sup>81</sup>. ERT only slightly delays the progression of chronic kidney disease, and a steady decline in glomerular filtration rate is still observed in Fabry disease patients receiving long-term ERT<sup>82</sup>. Podocytes rely on a constant supply of lipids and proteins to form foot processes<sup>71</sup>. However, lipid overload causes lipotoxicity. Lipid accumulation and increased inflammation accelerate lipotoxicity and induce glomerular disease<sup>83</sup>. Imbalanced lipid metabolism can also impact mitochondrial function and dynamics that are essential in kidneys as they are one of the most energy demanding organs<sup>84</sup>. Increasing evidence suggests a strong association between mitochondrial dysfunction and chronic kidney diseases, and mitochondrial and lysosomal functions are intertwined, notably through membrane contact sites<sup>85</sup>. Reducing intracellular lipids could therefore represent a new therapeutic approach to slow the progression of CKD.

The identification of new specific biomarkers in Fabry disease using a proteomic approach, and their validation in an independent cohort, paves the way for possible clinical application. These biomarkers are a serious lead in the search for new specific biomarkers in Fabry disease. Metabolic profile differences between Fabry and control plasma samples were shown by Ducatez *et al.*<sup>86</sup>. The use of extended biomarker profiles including proteins and metabolites would allow the full potential of omics approaches to be exploited.

## References

- 1 Beck, M. Agalsidase alfa--a preparation for enzyme replacement therapy in Anderson-Fabry disease. *Expert Opin Investig Drugs* **11**, 851-858, doi:10.1517/13543784.11.6.851 (2002).
- 2 Sweeley, C. C. & Klionsky, B. Fabry's Disease: Classification as a Sphingolipidosis and Partial Characterization of a Novel Glycolipid. *J Biol Chem* **238**, 3148-3150 (1963).
- 3 Kok, K. *et al.* Fabry Disease: Molecular Basis, Pathophysiology, Diagnostics and Potential Therapeutic Directions. *Biomolecules* **11**, doi:10.3390/biom11020271 (2021).
- 4 Arends, M. *et al.* Characterization of Classical and Nonclassical Fabry Disease: A Multicenter Study. *J Am Soc Nephrol* **28**, 1631-1641, doi:10.1681/ASN.2016090964 (2017).
- 5 Sheth, K. J., Werlin, S. L., Freeman, M. E. & Hodach, A. E. Gastrointestinal structure and function in Fabry's disease. *Am J Gastroenterol* **76**, 246-251 (1981).
- 6 Hoffmann, B., Schwarz, M., Mehta, A., Keshav, S. & Fabry Outcome Survey European, I. Gastrointestinal symptoms in 342 patients with Fabry disease: prevalence and response to enzyme replacement therapy. *Clin Gastroenterol Hepatol* **5**, 1447-1453, doi:10.1016/j.cgh.2007.08.012 (2007).
- 7 Maier, E. M. *et al.* Disease manifestations and X inactivation in heterozygous females with Fabry disease. *Acta Paediatr Suppl* **95**, 30-38, doi:10.1080/08035320600618809 (2006).
- 8 Spada, M. *et al.* High incidence of later-onset fabry disease revealed by newborn screening. *Am J Hum Genet* **79**, 31-40, doi:10.1086/504601 (2006).
- 9 Hwu, W. L. *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* **30**, 1397-1405, doi:10.1002/humu.21074 (2009).
- 10 Meikle, P. J., Hopwood, J. J., Clague, A. E. & Carey, W. F. Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA* **281**, 249-254, doi:10.1001/jama.281.3.249 (1999).
- 11 Desnick, R. J., Ioannou, Y. A. & Eng, C. in *The metabolic and molecular basis of inherited disease* (eds C. R. Scriver, A.L. Beaudet, W. S. Sly, & D. Valle) 3733-3774 (McGraw-Hill, 2001).
- 12 Desnick, R. J. *et al.* Fabry's disease: enzymatic diagnosis of hemizygotes and heterozygotes. Alpha-galactosidase activities in plasma, serum, urine, and leukocytes. *J Lab Clin Med* **81**, 157-171 (1973).
- 13 Chamoles, N. A., Blanco, M. & Gaggioli, D. Fabry disease: enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper. *Clin Chim Acta* **308**, 195-196, doi:10.1016/s0009-8981(01)00478-8 (2001).
- 14 Ferri, L. *et al.* Fabry disease: polymorphic haplotypes and a novel missense mutation in the GLA gene. *Clin Genet* **81**, 224-233, doi:10.1111/j.1399-0004.2011.01689.x (2012).
- 15 Svarstad, E. & Marti, H. P. The Changing Landscape of Fabry Disease. *Clin J Am Soc Nephrol* **15**, 569-576, doi:10.2215/CJN.09480819 (2020).
- 16 Rombach, S. M. *et al.* Plasma globotriaosylsphingosine: diagnostic value and relation to clinical manifestations of Fabry disease. *Biochim Biophys Acta* **1802**, 741-748, doi:10.1016/j.bbadis.2010.05.003 (2010).
- 17 Cairns, T. *et al.* Hot topics in Fabry disease. *Postgrad Med J* **94**, 709-713, doi:10.1136/postgradmedj-2018-136056 (2018).
- 18 Nowak, A. *et al.* Genotype, phenotype and disease severity reflected by serum LysoGb3 levels in patients with Fabry disease. *Mol Genet Metab* **123**, 148-153, doi:10.1016/j.ymgme.2017.07.002 (2018).
- 19 Arends, M. *et al.* Retrospective study of long-term outcomes of enzyme replacement therapy in Fabry disease: Analysis of prognostic factors. *PLoS One* **12**, e0182379, doi:10.1371/journal.pone.0182379 (2017).
- 20 Young, E. *et al.* Is globotriaosylceramide a useful biomarker in Fabry disease? *Acta Paediatr Suppl* **94**, 51-54; discussion 37-58, doi:10.1111/j.1651-2227.2005.tb02112.x (2005).

- 21 Bichet, D. G. *et al.* Assessment of plasma lyso-Gb3 for clinical monitoring of treatment response in migalastat-treated patients with Fabry disease. *Genet Med* **23**, 192-201, doi:10.1038/s41436-020-00968-z (2021).
- 22 Simonetta, I., Tuttolomondo, A., Daidone, M. & Pinto, A. Biomarkers in Anderson-Fabry Disease. *Int J Mol Sci* **21**, doi:10.3390/ijms21218080 (2020).
- 23 Arends, M. *et al.* Agalsidase alfa versus agalsidase beta for the treatment of Fabry disease: an international cohort study. *J Med Genet* **55**, 351-358, doi:10.1136/jmedgenet-2017-104863 (2018).
- 24 Hughes, D. A. *et al.* Oral pharmacological chaperone migalastat compared with enzyme replacement therapy in Fabry disease: 18-month results from the randomised phase III ATTRACT study. *J Med Genet* **54**, 288-296, doi:10.1136/jmedgenet-2016-104178 (2017).
- 25 Ballabio, A. & Bonifacino, J. S. Lysosomes as dynamic regulators of cell and organismal homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **21**, 101-118, doi:10.1038/s41580-019-0185-4 (2020).
- 26 Chevrier, M. *et al.* Autophagosome maturation is impaired in Fabry disease. *Autophagy* **6**, 589-599, doi:10.4161/auto.6.5.11943 (2010).
- 27 Rozenfeld, P. & Feriozzi, S. Contribution of inflammatory pathways to Fabry disease pathogenesis. *Mol Genet Metab* **122**, 19-27, doi:10.1016/j.ymgme.2017.09.004 (2017).
- 28 Tuttolomondo, A. *et al.* Pathogenesis and Molecular Mechanisms of Anderson-Fabry Disease and Possible New Molecular Addressed Therapeutic Strategies. *Int J Mol Sci* **22**, doi:10.3390/ijms221810088 (2021).
- 29 Tebani, A. *et al.* A Proteomics-Based Analysis Reveals Predictive Biological Patterns in Fabry Disease. *J Clin Med* **9**, doi:10.3390/jcm9051325 (2020).
- 30 Hui, Q., Jin, Z., Li, X., Liu, C. & Wang, X. FGF Family: From Drug Development to Clinical Application. *Int J Mol Sci* **19**, doi:10.3390/ijms19071875 (2018).
- 31 Murakami, M. & Simons, M. Fibroblast growth factor regulation of neovascularization. *Curr Opin Hematol* **15**, 215-220, doi:10.1097/MOH.0b013e3282f97d98 (2008).
- 32 Lee, M. H., Choi, E. N., Jeon, Y. J. & Jung, S. C. Possible role of transforming growth factor-beta1 and vascular endothelial growth factor in Fabry disease nephropathy. *Int J Mol Med* **30**, 1275-1280, doi:10.3892/ijmm.2012.1139 (2012).
- 33 Krawczyński, A., Kieda, C. & Dus, D. The biological role and potential therapeutic application of interleukin 7. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **53**, 518-525 (2005).
- 34 Watanabe, M. *et al.* Interleukin 7 is produced by human intestinal epithelial cells and regulates the proliferation of intestinal mucosal lymphocytes. *J Clin Invest* **95**, 2945-2953, doi:10.1172/JCI118002 (1995).
- 35 Murray, A. M., Simm, B. & Beagley, K. W. Cytokine gene expression in murine fetal intestine: potential for extrathymic T cell development. *Cytokine* **10**, 337-345, doi:10.1006/cyto.1997.0302 (1998).
- 36 Namen, A. E. *et al.* Stimulation of B-cell progenitors by cloned murine interleukin-7. *Nature* **333**, 571-573, doi:10.1038/333571a0 (1988).
- 37 Heufler, C. *et al.* Interleukin 7 is produced by murine and human keratinocytes. *J Exp Med* **178**, 1109-1114, doi:10.1084/jem.178.3.1109 (1993).
- 38 Kim, G. Y., Hong, C. & Park, J. H. Seeing is believing: illuminating the source of in vivo interleukin-7. *Immune Netw* **11**, 1-10, doi:10.4110/in.2011.11.1.1 (2011).
- 39 Barata, J. T., Durum, S. K. & Seddon, B. Flip the coin: IL-7 and IL-7R in health and disease. *Nat Immunol* **20**, 1584-1593, doi:10.1038/s41590-019-0479-x (2019).
- 40 Petiot, A., Ogier-Denis, E., Blommaert, E. F., Meijer, A. J. & Codogno, P. Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. *J Biol Chem* **275**, 992-998, doi:10.1074/jbc.275.2.992 (2000).
- 41 McLeod, I. X., Zhou, X., Li, Q. J., Wang, F. & He, Y. W. The class III kinase Vps34 promotes T lymphocyte survival through regulating IL-7Ralpha surface expression. *J Immunol* **187**, 5051-5061, doi:10.4049/jimmunol.1100710 (2011).

- 42 Polo, G. *et al.* Plasma and dried blood spot lysosphingolipids for the diagnosis of different sphingolipidoses: a comparative study. *Clin Chem Lab Med* **57**, 1863-1874, doi:10.1515/cclm-2018-1301 (2019).
- 43 Pereira, E. M. *et al.* Characterization and phosphoproteomic analysis of a human immortalized podocyte model of Fabry disease generated using CRISPR/Cas9 technology. *Am J Physiol Renal Physiol* **311**, F1015-F1024, doi:10.1152/ajprenal.00283.2016 (2016).
- 44 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* **515**, 171-176, doi:10.1016/s0014-5793(02)02491-2 (2002).
- 45 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).
- 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 Tebani, A. *et al.* A Proteomics-Based Analysis Reveals Predictive Biological Patterns in Fabry Disease. *J Clin Med* **9**, 1325, doi:10.3390/jcm9051325 (2020).
- 48 Okada-Ban, M., Thiery, J. P. & Jouanneau, J. Fibroblast growth factor-2. *Int J Biochem Cell Biol* **32**, 263-267, doi:10.1016/s1357-2725(99)00133-8 (2000).
- 49 Sasaki, T., Hatta, H. & Osawa, G. Cytokines and podocyte injury: the mechanism of fibroblast growth factor 2-induced podocyte injury. *Nephrol Dial Transplant* **14 Suppl 1**, 33-34, doi:10.1093/ndt/14.suppl\_1.33 (1999).
- 50 Yaoita, E., Nameta, M., Yoshida, Y. & Fujinaka, H. Dynamic changes of podocytes caused by fibroblast growth factor 2 in culture. *Cell Tissue Res* **386**, 117-126, doi:10.1007/s00441-021-03511-x (2021).
- 51 Asanuma, K., Shirato, I., Ishidoh, K., Kominami, E. & Tomino, Y. Selective modulation of the secretion of proteinases and their inhibitors by growth factors in cultured differentiated podocytes. *Kidney Int* **62**, 822-831, doi:10.1046/j.1523-1755.2002.00539.x (2002).
- 52 Hadpech, S. & Thongboonkerd, V. Epithelial-mesenchymal plasticity in kidney fibrosis. *Genesis*, e23529, doi:10.1002/dvg.23529 (2023).
- 53 Tan, Y. *et al.* Alternative polyadenylation writer CSTF2 forms a positive loop with FGF2 to promote tubular epithelial-mesenchymal transition and renal fibrosis. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* **1868**, 166541, doi:10.1016/j.bbadis.2022.166541 (2022).
- 54 Rozenfeld, P. A. *et al.* Pathogenesis of Fabry nephropathy: The pathways leading to fibrosis. *Mol Genet Metab* **129**, 132-141, doi:10.1016/j.ymgme.2019.10.010 (2020).
- 55 Schunk, S. J., Floege, J., Fliser, D. & Speer, T. WNT-beta-catenin signalling - a versatile player in kidney injury and repair. *Nat Rev Nephrol* **17**, 172-184, doi:10.1038/s41581-020-00343-w (2021).
- 56 Huffstater, T., Merryman, W. D. & Gewin, L. S. Wnt/beta-Catenin in Acute Kidney Injury and Progression to Chronic Kidney Disease. *Semin Nephrol* **40**, 126-137, doi:10.1016/j.semnephrol.2020.01.004 (2020).
- 57 Feghali, C. A. & Wright, T. M. Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front Biosci* **2**, d12-26, doi:10.2741/a171 (1997).
- 58 Lee, L. F. *et al.* Anti-IL-7 receptor-alpha reverses established type 1 diabetes in nonobese diabetic mice by modulating effector T-cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 12674-12679, doi:10.1073/pnas.1203795109 (2012).
- 59 Churchman, S. M. & Ponchel, F. Interleukin-7 in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* **47**, 753-759, doi:10.1093/rheumatology/ken053 (2008).
- 60 Anderson, C. A. *et al.* Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. *Nat Genet* **43**, 246-252, doi:10.1038/ng.764 (2011).

- 61 Esposito, K. *et al.* Effect of a mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome: a randomized trial. *JAMA* **292**, 1440-1446, doi:10.1001/jama.292.12.1440 (2004).
- 62 Zhu, Y., Jiang, X., Ding, Z. & Ming, J. Interleukin 7 inhibit autophagy via P53 regulated AMPK/mTOR signaling pathway in non-small cell lung cancer. *Sci Rep* **12**, 11208, doi:10.1038/s41598-022-14742-5 (2022).
- 63 Jian, M., Yunjia, Z., Zhiying, D., Yanduo, J. & Guocheng, J. Interleukin 7 receptor activates PI3K/Akt/mTOR signaling pathway via downregulation of Beclin-1 in lung cancer. *Mol Carcinog* **58**, 358-365, doi:10.1002/mc.22933 (2019).
- 64 Zhai, S., Zhao, L., Zhang, Y. & Ma, Q. Interleukin-7 stimulation inhibits nephrin activation and induces podocyte injury. *Biochem Biophys Res Commun* **507**, 100-105, doi:10.1016/j.bbrc.2018.10.173 (2018).
- 65 Nakamura, Y. Multiple Therapeutic Applications of RBM-007, an Anti-FGF2 Aptamer. *Cells* **10**, doi:10.3390/cells10071617 (2021).
- 66 Zhang, C. *et al.* Quantitative profiling of glycerophospholipids during mouse and human macrophage differentiation using targeted mass spectrometry. *Sci Rep* **7**, 412, doi:10.1038/s41598-017-00341-2 (2017).
- 67 Slotte, J. P. Biological functions of sphingomyelins. *Prog Lipid Res* **52**, 424-437, doi:10.1016/j.plipres.2013.05.001 (2013).
- 68 Maalouf, K. *et al.* A modified lipid composition in Fabry disease leads to an intracellular block of the detergent-resistant membrane-associated dipeptidyl peptidase IV. *J Inherit Metab Dis* **33**, 445-449, doi:10.1007/s10545-010-9114-6 (2010).
- 69 Fuller, M. *et al.* Urinary lipid profiling for the identification of fabry hemizygotes and heterozygotes. *Clin Chem* **51**, 688-694, doi:10.1373/clinchem.2004.041418 (2005).
- 70 Escriba, P. V. *et al.* Membrane lipid therapy: Modulation of the cell membrane composition and structure as a molecular base for drug discovery and new disease treatment. *Prog Lipid Res* **59**, 38-53, doi:10.1016/j.plipres.2015.04.003 (2015).
- 71 Fornoni, A., Merscher, S. & Kopp, J. B. Lipid biology of the podocyte--new perspectives offer new opportunities. *Nat Rev Nephrol* **10**, 379-388, doi:10.1038/nrneph.2014.87 (2014).
- 72 Koberlin, M. S. *et al.* A Conserved Circular Network of Coregulated Lipids Modulates Innate Immune Responses. *Cell* **162**, 170-183, doi:10.1016/j.cell.2015.05.051 (2015).
- 73 Merrill, A. H., Jr. & Jones, D. D. An update of the enzymology and regulation of sphingomyelin metabolism. *Biochim Biophys Acta* **1044**, 1-12, doi:10.1016/0005-2760(90)90211-f (1990).
- 74 Head, B. P., Patel, H. H. & Insel, P. A. Interaction of membrane/lipid rafts with the cytoskeleton: impact on signaling and function: membrane/lipid rafts, mediators of cytoskeletal arrangement and cell signaling. *Biochim Biophys Acta* **1838**, 532-545, doi:10.1016/j.bbamem.2013.07.018 (2014).
- 75 Kuech, E. M., Brogden, G. & Naim, H. Y. Alterations in membrane trafficking and pathophysiological implications in lysosomal storage disorders. *Biochimie* **130**, 152-162, doi:10.1016/j.biochi.2016.09.011 (2016).
- 76 Merscher, S. & Fornoni, A. Podocyte pathology and nephropathy - sphingolipids in glomerular diseases. *Front Endocrinol (Lausanne)* **5**, 127, doi:10.3389/fendo.2014.00127 (2014).
- 77 Shayman, J. A. Targeting Glucosylceramide Synthesis in the Treatment of Rare and Common Renal Disease. *Semin Nephrol* **38**, 183-192, doi:10.1016/j.semnephrol.2018.01.007 (2018).
- 78 Labilloy, A. *et al.* Altered dynamics of a lipid raft associated protein in a kidney model of Fabry disease. *Mol Genet Metab* **111**, 184-192, doi:10.1016/j.ymgme.2013.10.010 (2014).
- 79 Lidgard, B. *et al.* High-Density Lipoprotein Lipidomics in Chronic Kidney Disease. *Clin Chem* **69**, 273-282, doi:10.1093/clinchem/hvac216 (2023).
- 80 Eng, C. M. *et al.* Fabry disease: baseline medical characteristics of a cohort of 1765 males and females in the Fabry Registry. *J Inherit Metab Dis* **30**, 184-192, doi:10.1007/s10545-007-0521-2 (2007).

- 81 Ortiz, A. *et al.* End-stage renal disease in patients with Fabry disease: natural history data from the Fabry Registry. *Nephrol Dial Transplant* **25**, 769-775, doi:10.1093/ndt/gfp554 (2010).
- 82 Weidemann, F. *et al.* Long-term outcome of enzyme-replacement therapy in advanced Fabry disease: evidence for disease progression towards serious complications. *J Intern Med* **274**, 331-341, doi:10.1111/joim.12077 (2013).
- 83 Martinez-Garcia, C. *et al.* Renal Lipotoxicity-Associated Inflammation and Insulin Resistance Affects Actin Cytoskeleton Organization in Podocytes. *PLoS One* **10**, e0142291, doi:10.1371/journal.pone.0142291 (2015).
- 84 Ge, M., Fontanesi, F., Merscher, S. & Fornoni, A. The Vicious Cycle of Renal Lipotoxicity and Mitochondrial Dysfunction. *Front Physiol* **11**, 732, doi:10.3389/fphys.2020.00732 (2020).
- 85 Wong, Y. C., Kim, S., Peng, W. & Krainc, D. Regulation and Function of Mitochondria-Lysosome Membrane Contact Sites in Cellular Homeostasis. *Trends Cell Biol* **29**, 500-513, doi:10.1016/j.tcb.2019.02.004 (2019).
- 86 Ducatez, F. *et al.* Parsing Fabry Disease Metabolic Plasticity Using Metabolomics. *J Pers Med* **11**, doi:10.3390/jpm11090898 (2021).

## Legend captions

Figure 1. Overview of the cohorts' characteristics. A) Cohorts' sizes. B) Sex, C) phenotype, and D) treatment distribution in the discovery and validation Fabry cohorts.

Figure 2. FGF2 (right) and IL-7 (left) plasma concentrations.

Figure 3. Experimental overview.

Figure 4. Exploratory analysis in each condition showing a potential negative effect of IL-7 and/or FGF2 on Gb3 accumulation.

Figure 5. Overview of metabolomics differential expression analysis in control and treated Fabry cells.

Figure 6. Differentially expressed metabolites in control and treated Fabry cells.

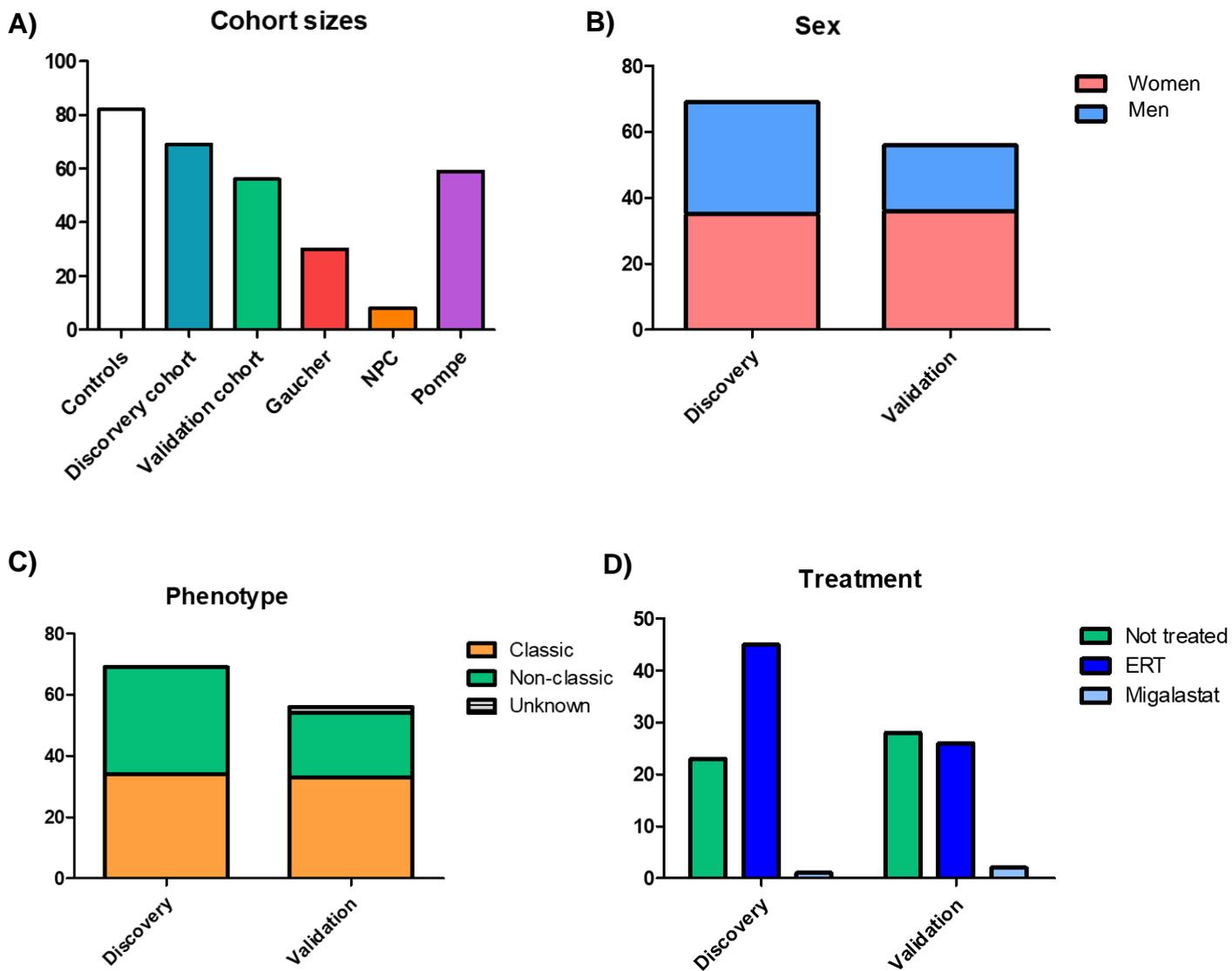


Figure 1. Overview of the cohorts' characteristics. A) Cohorts' sizes, B) Sex, C) phenotype, and D) treatment distribution in the discovery and validation Fabry cohorts.

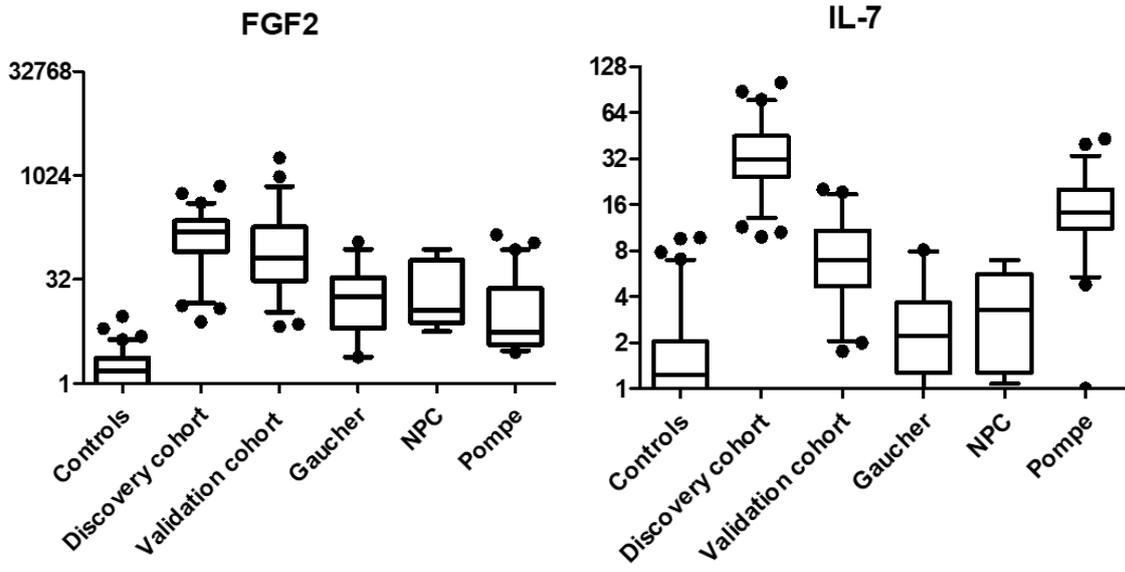


Figure 2. FGF2 (left) and IL-7 (right) plasma concentrations.

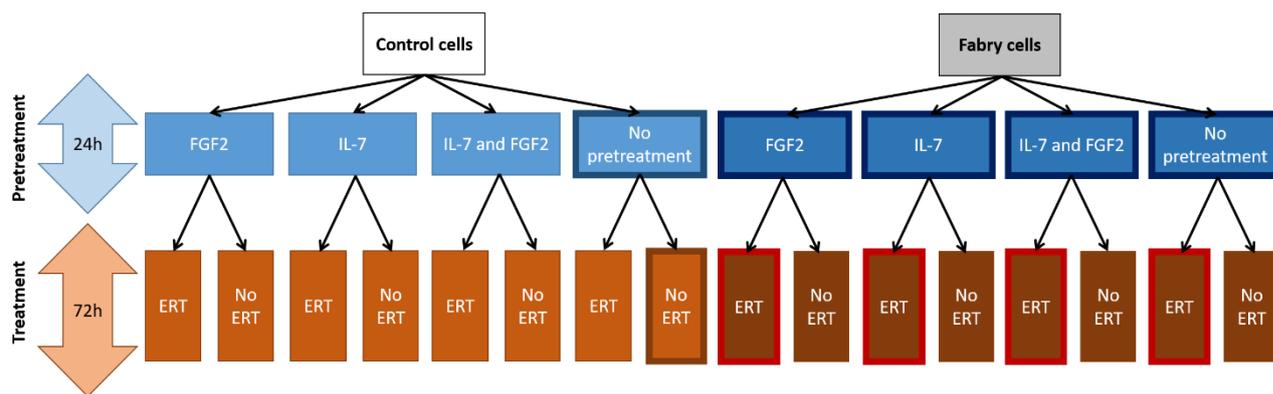


Figure 3. Experimental overview. Conditions with a larger outline are the conditions for which a metabolomics analysis was conducted.

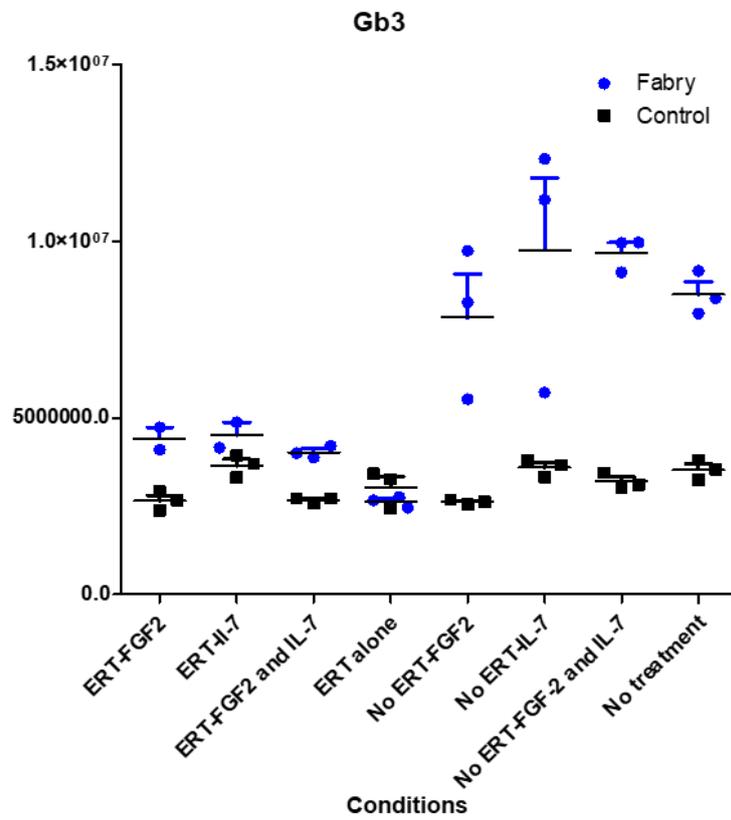


Figure 4. Exploratory analysis in each condition showing a potential negative effect of IL-7 and/or FGF2 on Gb3 accumulation.

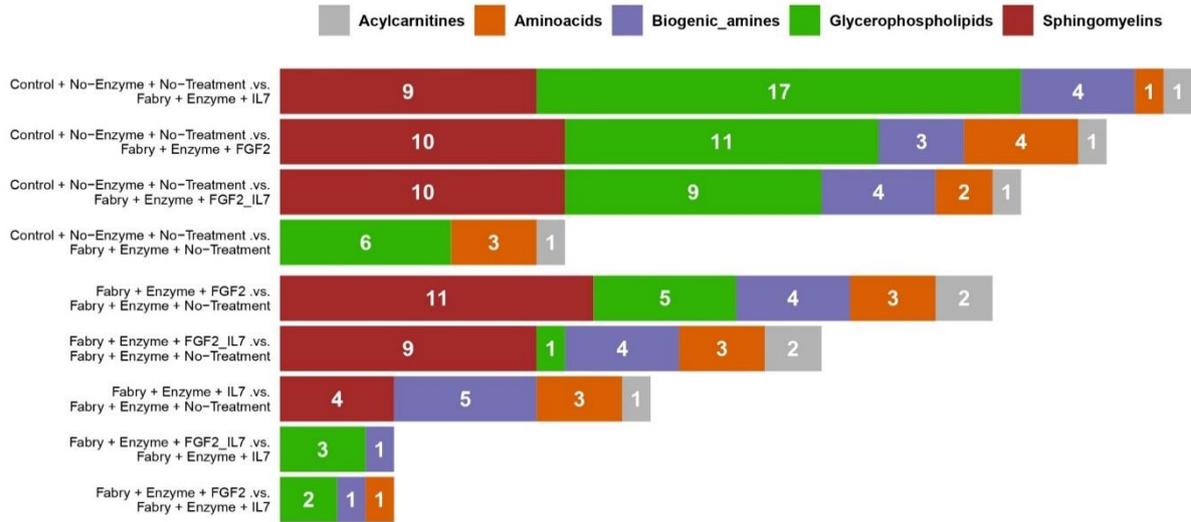


Figure 5. Overview of metabolomics differential expression analysis in control and treated Fabry cells.



Figure 6. Differentially expressed metabolites in control and treated Fabry cells.

## CONCLUSION & PERSPECTIVES



À l'ère de la médecine de précision, des technologies avancées, tant sur le plan analytique qu'informatique, permettent d'explorer le vivant à des résolutions jusqu'ici inégalées. Dans le cadre des maladies rares, les outils de la biologie des systèmes permettent de mieux comprendre la physiopathologie et d'identifier de nouveaux biomarqueurs ainsi que de nouvelles cibles thérapeutiques.

La maladie de Fabry est une maladie lysosomale rare. Le lysosome est au centre du catabolisme cellulaire, mais est également un élément clé de l'homéostasie cellulaire au-delà de ses fonctions de dégradation. Il constitue, ainsi, un « hub » métabolique qui orchestre la signalisation cellulaire et régule les autres organites cellulaires (mitochondries, réticulum endoplasmique, peroxyosomes...). Bien que la maladie de Fabry dispose de plusieurs traitements, ceux-ci ne permettent pas d'arrêter complètement l'évolution de la maladie. Il existe également un manque de biomarqueurs : un seul biomarqueur, le lyso-Gb3, est disponible. Mais celui-ci n'est pas performant dans tous les contextes, notamment dans le cadre du suivi de la réponse au traitement. Il s'agit d'un biomarqueur reflétant l'accumulation du substrat de l'enzyme déficiente, non représentatif de la complexité de la physiopathologie de la maladie.

L'objectif de ce travail était de mettre en œuvre les sciences omiques dans la maladie de Fabry afin d'explorer ses mécanismes physiopathologiques ainsi que de confirmer la pertinence de nouveaux biomarqueurs.

Dans la première partie de ce travail, nous avons appliqué une approche transcriptomique sur une lignée de podocytes invalidés pour le gène *GLA* vs. podocytes contrôles.

Les 20 gènes les plus différenciellement exprimés sont impliqués notamment dans le stress oxydatif, l'inflammation, le métabolisme des acides gras, de l'homéostasie du collagène et de la matrice extracellulaire, de l'autophagie et du stress du réticulum endoplasmique. Ces perturbations ont déjà été décrites dans la maladie de Fabry. Une modification de l'expression de gènes impliqués dans la voie de signalisation Wnt et la voie de signalisation Hippo, deux voies interconnectées affectant la régulation immunitaire et la survie cellulaire, a également été décrite. Une perturbation de ces voies métaboliques n'a pas, à notre connaissance, été rapportée auparavant dans la littérature.

Une perturbation de la voie de signalisation Hippo a été rapportée dans une autre maladie lysosomale, la maladie de Gaucher, avec une hyperactivation de cette voie entraînant une inhibition de gènes anti-apoptotiques et de gènes de prolifération<sup>652</sup>. Cette hyperactivation entraîne également une réduction de l'activité transcriptionnelle de *YAP* (*Yes associated protein*), un effecteur terminal de la voie de signalisation<sup>652</sup>. De façon intéressante, *YAP1* est sous-exprimé dans les podocytes Fabry par rapport aux podocytes contrôles dans notre étude (*adjusted p value* 0,0264 ; *Supplementary Table S2*).

Dans ce cadre, il est prévu d'explorer cette voie métabolique par l'étude de l'expression du ratio entre la forme phosphorylée de YAP et la quantité de protéine YAP totale ainsi que de la localisation de la protéine (nucléaire ou cytoplasmique).

Les résultats obtenus ont permis de réaliser une modélisation métabolique à l'échelle du génome. Cette approche a mis en évidence une transformation marquée du flux métabolique dans les cellules Fabry, une altération du contenu cellulaire et de l'utilisation d'énergie.

Une régulation à la baisse du métabolisme des phospholipides a été mise en évidence. La synthèse des phospholipides ayant lieu à la face cytosolique de la membrane du réticulum endoplasmique, le stress du réticulum endoplasmique ainsi que la perturbation des sites de contact (MCS) décrits dans les maladies lysosomales, pourraient expliquer cette dérégulation<sup>653</sup>.

Une régulation à la baisse de la dégradation de l'héparane sulfate a également été mise en évidence. Ceci pourrait s'expliquer par la dysfonction lysosomale. Une augmentation de la concentration en Lyso-Gb3 a été rapportée chez des patients non traités atteints de mucopolysaccharidoses avec une atteinte neuronale, dont les MPSI, II et III caractérisées par l'accumulation de sulfate d'héparane<sup>654</sup>. Il a été montré que l'activité  $\alpha$ -GAL n'est pas inhibée par l'héparane sulfate *in vitro* mais le mécanisme physiopathologique n'est pas encore élucidé. L'hypothèse d'une voie métabolique commune pourrait être envisagée. Un dosage de l'héparane sulfate chez les patients Fabry non traités pourrait être réalisé (héparane sulfate urinaire et/ou sanguin sur papier buvard). L'accumulation d'héparane sulfate pourrait participer à l'atteinte neuronale décrite dans la maladie de Fabry.

Une régulation à la hausse de plusieurs métabolismes a été mise en évidence, dont des métabolismes impliquées dans le stress oxydant ainsi que le métabolisme des leucotriènes et des eicosanoïdes. Ces perturbations sont en faveur de l'intérêt de l'association des traitements spécifiques de la maladie de Fabry (ERT, molécule chaperonne) à des anti-oxydants et anti-inflammatoires (molécules ciblant le métabolisme de l'acide arachidonique, précurseur des eicosanoïdes et des leucotriènes), d'autant plus qu'il s'agit d'interventions simples : approche nutritionnelle, molécules précédemment caractérisées.

Le métabolisme énergétique est également montré comme étant perturbé par notre étude. Une perturbation du métabolisme énergétique cardiaque a déjà été décrite dans la maladie de Fabry<sup>655</sup>. Une étude du métabolisme énergétique rénal pourrait être réalisée par une approche par spectroscopie par RMN au <sup>31</sup>P chez les patients Fabry, avant et après traitement.

Une étude de repositionnement de médicaments est également en cours. En effet, nous avons identifié une molécule pouvant agir sur les voies métaboliques dérégulées dans les podocytes Fabry. Des explorations sont en cours pour valider ce résultat.

D'autre part, nous avons validé les résultats d'une étude protéomique précédente et caractérisé l'effet des biomarqueurs candidats à l'aide d'une approche métabolomique dans un modèle cellulaire de maladie de Fabry. Les principaux effets mis en évidence sont des altérations de plusieurs classes de lipides, pouvant ainsi perturber la composition des membranes cellulaires. Des recherches approfondies sont en cours pour évaluer la variation de ces biomarqueurs en relation avec les données cliniques et biologiques des patients ainsi que l'effet de ces biomarqueurs sur le profil métabolique du milieu de culture du modèle cellulaire.

La mise en évidence de nouveaux biomarqueurs spécifiques dans la maladie de Fabry grâce à une approche protéomique et leur validation dans une cohorte indépendante ouvre la voie à une éventuelle application en clinique. Pour cela, une étude prospective de l'évolution de ces biomarqueurs permettrait de déterminer leur valeur pronostique et dans le suivi de l'évolution sous traitement, que ce soit par ERT ou par molécule chaperonne. Cette étude pourrait également évaluer l'intérêt d'une approche intégrée en associant ces deux marqueurs protéiques au profil métabolique mis en évidence par Ducatez *et al.*<sup>625</sup>.

Ce travail a permis de caractériser l'effet de l'élévation du FGF2 et de l'IL-7 dans les podocytes Fabry. Il serait aussi intéressant de caractériser cet effet dans d'autres types cellulaires relevant dans la maladie de Fabry mais aussi d'étudier l'impact d'une inhibition de ces protéines. Dans ce cadre, il existe un aptamère anti-FGF2. Les aptamères sont des oligonucléotides synthétiques capables de fixer un ligand spécifique, voire de catalyser une réaction chimique sur ce ligand. Ils agissent d'une manière comparable aux anticorps mais avec un poids moléculaire bien moindre. L'aptamère anti-FGF2 (RBM-007) a fait l'objet d'essais cliniques dans l'achondroplasie et la dégénérescence maculaire liée à l'âge. Des essais pré-cliniques sont en faveur d'un effet thérapeutique dans le cancer du poumon et dans les douleurs liées aux cancers. Des anticorps anti-IL7 et anti-IL7R sont également disponibles.

Il est envisagé d'évaluer l'effet de ces inhibiteurs dans un modèle de cellules Fabry ainsi que dans un modèle murin de maladie de Fabry. Dans un modèle animal, la première étape consisterait en la caractérisation de l'expression du FGF2 et de l'IL-7 dans le plasma. L'effet des inhibiteurs, associés ou non à une ERT, pourra être évalué à différents âges et dans différents organes (cœur, rein, cerveau, plasma, etc.) par le dosage du Lyso-Gb3 et du LC3-II, l'étude de l'histologie rénale, des altérations myocardiques (contractibilité du VG, rigidité du VG, taille et architecture des myocytes), de la rigidité artérielle, etc.

La maladie de Fabry est une maladie très probablement sous diagnostiquée. En effet, elle est peu connue car rare, avec des symptômes variables et souvent frustrés. Cependant, elle peut être diagnostiquée par un grand nombre de spécialistes différents : médecin généraliste, pédiatre,

neurologue, cardiologue, néphrologue, ophtalmologue, dermatologue... La sensibilisation de tous ces spécialistes permet de réduire le délai diagnostique et d'améliorer le confort, la qualité de vie et le pronostic fonctionnel des patients.

Si la formation des médecins et le dépistage des populations à risque sont essentiels dans le diagnostic de la maladie de Fabry, les sciences omiques ont toute leur place dans la compréhension de la pathologie afin d'identifier de nouvelles molécules telles que des biomarqueurs et des cibles thérapeutiques, l'objectif étant d'améliorer la prise en charge et le suivi des patients.

Au-delà de la compréhension des mécanismes physiopathologiques, une grande part d'ombre dans cette maladie est la compréhension de la variabilité phénotypique. Si une corrélation phénotype-génotype partielle est établie, la question de l'effet des différents variants expliquant un phénotype classique pour certains variants et un phénotype non classique pour d'autres, avec des atteintes d'organes spécifiques dans certains cas, se pose. De même, pourquoi existe-t-il une variabilité phénotypique pour un même variant, y compris au sein d'une même famille ? Quels sont les facteurs modificateurs ? Les réponses à ces questions pourraient permettre d'établir un pronostic plus personnalisé et de cibler la surveillance et le traitement des atteintes d'organes. À notre connaissance, aucune étude d'association à l'échelle du génome (GWAS) n'a été rapportée dans la littérature. Une telle approche pourrait permettre l'identification de gènes ou de variants modificateurs.

La maladie de Fabry, comme d'autres maladies, fait l'objet de nombreuses recherches avec une littérature riche. Malgré cela, la compréhension de la physiopathologie est incomplète et la prise en charge (biomarqueurs, traitements) n'est pas entièrement satisfaisante. Les approches omiques, et *a fortiori* multi-omiques, permettent une approche plus globale de la pathologie et de sa complexité avec l'identification de nouvelles molécules candidates ou cibles potentielles. On peut affirmer un changement de paradigme par rapport aux approches ciblées, ou bien considérer que les données obtenues (les *big data*) viennent nourrir la formulation de théories et d'hypothèses qui seront ensuite testées par des approches plus conventionnelles (**Figure 76**).

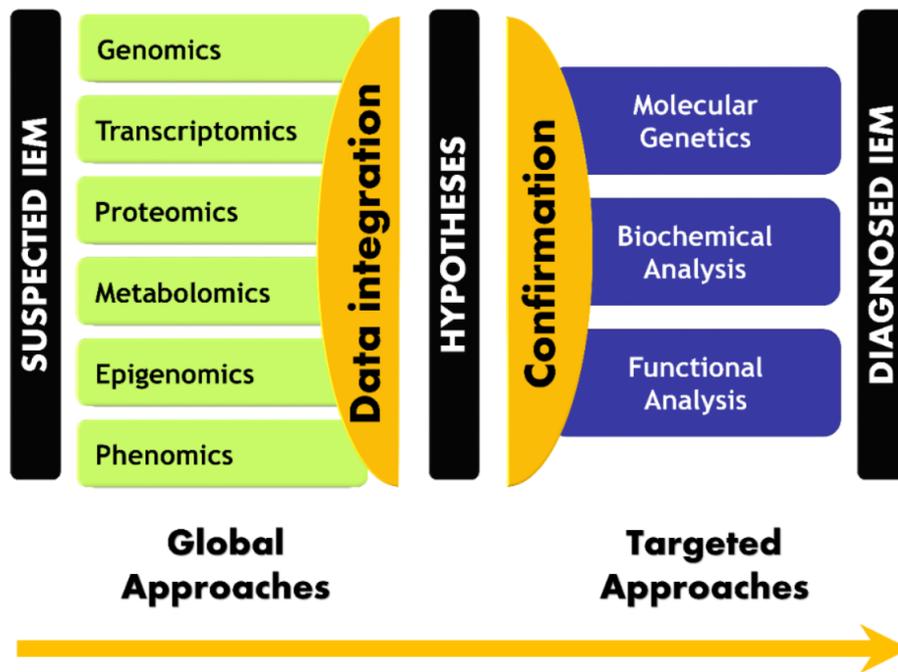


Figure 76. Représentation du changement de paradigme dans l'exemple du diagnostic des maladies héréditaires du métabolisme.

Tebani A et al. *Int J Mol Sci.* 2016<sup>479</sup>

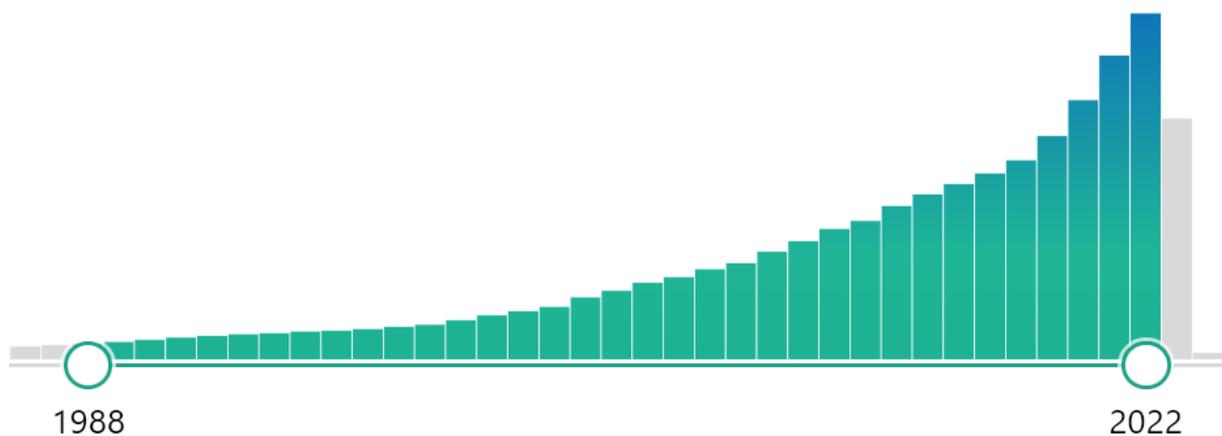
Ces avancées technologiques ouvrent également la voie à un changement du paradigme unitaire : d'un biomarqueur unique, on peut être amené à considérer une combinaison de plusieurs biomarqueurs, voire un profil de biomarqueurs. Les explorations peuvent être unimodales (profil de protéines, de métabolites) ou multimodales. Les données sont alors intégrées de manière efficace grâce aux approches bioinformatiques. Ce concept de multimodalité peut être étendu à d'autres types d'exploration telles que l'imagerie médicale ou l'anatomopathologie. L'intégration des données omiques ou de données plus ciblées identifiées grâce aux approches omiques pourrait permettre d'individualiser encore davantage la prise en charge des patients.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons utilisé des approches ciblées (métabolomique ciblée, validation de résultats de protéomique ciblée) ainsi que non ciblées (transcriptomique). Les approches ciblées sont généralement plus précises et plus sensibles que les approches non ciblées. Elles nécessitent moins de ressources en termes de coûts, de temps et de puissance de calcul, avec une réduction du risque d'obtenir des données concernant des molécules non identifiables. Si elles présentent un biais de sélection, elles sont cependant adaptées dans le cadre de pathologies pour lesquelles la physiopathologie est déjà, même partiellement, connue. Les deux types d'approches ne sont pas antagonistes mais plutôt complémentaires et peuvent être utilisées de manière conjointe ou séquentielle.

Les avancées technologiques sont un phénomène continu et de nouvelles techniques continuent de voir le jour, permettant d'améliorer la qualité des données obtenues ou d'obtenir des informations biologiques jusque-là inaccessibles. Parmi les techniques récemment développées, nous pouvons citer :

- Le séquençage de longs fragments d'ADN (*long read*) permettant de séquencer des fragments d'ADN de plusieurs milliers de nucléotides (contre quelques centaines pour le séquençage *short read* conventionnel). Cette approche permet de faciliter l'assemblage de génomes de novo, d'explorer les remaniements complexes de l'ADN ainsi que de séquencer des régions du génome jusque-là inaccessibles telles que le chromosome Y<sup>656</sup>. Différentes technologies sont maintenant disponibles – Illumina, PacBio et Oxford Nanopore – et également applicables sur l'ARN.
- Une autre approche permettant d'appréhender l'assemblage de novo et les remaniements complexes du génome est la cartographie optique du génome (BioNano Genomics) qui consiste à établir un profil enzymatique de molécules d'ADN génomique basé sur la taille et l'ordre des fragments obtenus après digestion et/ou marquage, les fragments obtenus ayant un très haut poids moléculaire (plusieurs centaines de kb).
- L'association des techniques de biologie moléculaire avec l'identification de protéines par anticorps permet l'identification et la quantification de plusieurs milliers de protéines dans un même échantillon, participant ainsi à l'accélération de la recherche de nouveaux biomarqueurs. La technologie PEA (*Proximity Extension Assay*) d'Olink utilise des paires d'anticorps liés à des oligonucléotides qui permettent de capturer et de détecter les protéines cibles. La proximité des anticorps entraîne la formation d'un amplicon d'ADN qui peut être quantifié par PCR quantitative ou par séquençage NGS.
- Un autre pan majeur des nouvelles approches omiques est l'approche *Single Cell* (ou cellule unique). On accède maintenant individuellement à chaque cellule dans un ensemble en distinguant leurs propriétés spécifiques individuelles, en place et lieu d'une analyse moyennée à l'échelle d'un ensemble de cellules. Des données de transcriptomiques, d'accessibilité de la chromatine, d'expression des protéines de surface et récepteurs peuvent par exemple être obtenues de manière cellule-spécifique<sup>657</sup>. Ces analyses peuvent être réalisées de manière unimodale ou multimodale (séquençage du génome et du transcriptome sur une même cellule par exemple). Ces approches peuvent mettre en lumière divers phénomènes biologiques cruciaux qui, lorsqu'ils sont explorés à l'aide d'analyses faisant la moyenne des données sur de nombreuses cellules, sont soit invisibles soit caractérisés seulement partiellement.

Les sciences omiques ouvrent la voie à une compréhension holistique des voies métaboliques et de leurs perturbations grâce à la production d'une grande quantité de données et leur retraitement par des modèles mathématiques et l'intelligence artificielle. Elles permettent d'appréhender le métabolisme dans toute sa dynamique et sa complexité et non plus comme un métabolisme linéaire. Elles représentent ainsi une véritable révolution en recherche et en médecine avec de nombreux résultats et applications concrètes. Les rôles des molécules et les mécanismes de régulation découverts, toujours plus nombreux, ne cessent de transformer notre compréhension de la machinerie cellulaire (**Figure 77**).



*Figure 77. Augmentation exponentielle des publications scientifiques avec approches omiques. Recherche des termes « -omic\* » sur Pubmed : 1 662 papiers omiques publiés en 1988, l'année du début de l'Human Genome Project, 61 498 articles publiés en 2023.*

Cependant toutes ces avancées dévoilent toute l'étendue de la complexité du métabolisme, du fonctionnement cellulaire et des interactions moléculaires. Cette complexité se reflète notamment dans la variabilité des données de transcriptomique ou des études de l'organisation en trois dimensions de l'ADN par exemple. Mais l'évolution exponentielle des capacités d'analyse grâce aux avancées technologiques, à l'intelligence artificielle et à l'accumulation de données laissent entrevoir la possibilité de décrypter ces intrications complexes et d'en extraire des informations précieuses et jusqu'alors inaccessibles pour la médecine personnalisée notamment.

Un exemple de succès de l'intelligence artificielle dans la compréhension des processus biologique complexe est le programme AlphaFold développé par DeepMind, l'intelligence artificielle d'Alphabet, la maison mère de Google, et l'EMBL-EBI (*European Molecular Biology Laboratory-European Bioinformatics Institute*). Jusque-là, les structures d'environ 100 000 protéines étaient connues grâce à des approches expérimentales longues et coûteuses, représentant une fraction des millions de protéines connues. La seconde version du programme AlfaFold est la première méthode informatique

capable de prédire les structures en 3D des protéines à partir de leur séquence d'acides aminés avec une précision atomique, même dans les cas où aucune structure similaire n'est connue. La base de données AlphaFold (AlphaFold DB, <https://alphafold.ebi.ac.uk/>) offre aujourd'hui un accès ouvert à plus de 200 millions de prédictions de structures protéiques.

Au-delà de cette avancée inestimable en recherche, des outils d'intelligence artificielle sont d'ores et déjà mis au service des médecins et améliorent la prise en charge des patients : ils permettent de détecter des anomalies sur une image, une coupe tissulaire ou un électrocardiogramme. Si ces outils peuvent dépasser l'œil humain, ils ne remplacent pas l'œil de l'expert mais sont une aide précieuse pour l'amélioration du diagnostic et de la prise en charge du patient. L'intelligence artificielle peut être également mise au service de la santé publique en analysant les comptes-rendus des passages aux urgences, par exemple.

Un des défis à relever est l'intégration de ces outils au système de santé. Une numérisation des données et des investissements sont nécessaires, ainsi que la mise au point d'un modèle économique viable, la plupart des outils commercialisés actuellement étant facturés à l'utilisation avec un coût encore élevé. Se pose alors la question de la répartition du budget dans le cadre d'un système à bout de souffle, avec un manque important de personnel médical et paramédical, et des conditions d'exercice difficiles pour les professionnels. Mais si ces outils ne sont pas la solution pour remplacer le personnel manquant, ils peuvent permettre de libérer du temps pour des tâches avec une valeur ajoutée médicale.

La médecine de précision est une des clés pour améliorer la prise en charge et la qualité de vie des patients, mais également pour alléger les pressions sur notre système de santé grâce à des actions plus ciblées, plus pertinentes et à la réduction des errances diagnostiques et des effets secondaires de traitements non adaptés. Mais ces médecines-là vont de pair avec une approche multidimensionnelle du patient par la prise en compte de sa dimension sociale, psychologique, émotionnelle, environnementale, etc. Si les outils numériques doivent intégrer nos systèmes de santé, ils doivent permettre de donner du temps au médecin pour l'accompagnement du patient, de valoriser les interventions non médicamenteuses et de mettre au premier plan la prévention.

## Bibliographie

- 1 Ferreira, C. R., Rahman, S., Keller, M., Zschocke, J. & Group, I. A. An international classification of inherited metabolic disorders (ICIMD). *J Inherit Metab Dis* **44**, 164-177, doi:10.1002/jimd.12348 (2021).
- 2 *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., Valle, D., Childs, B., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B., eds., 8th ed., McGraw-Hill, New-York, 2001, 7012 p., \$550.00). Vol. 67 (2002).
- 3 Thiele, I. et al. A community-driven global reconstruction of human metabolism. *Nat Biotechnol* **31**, 419-425, doi:10.1038/nbt.2488 (2013).
- 4 Noronha, A. et al. ReconMap: an interactive visualization of human metabolism. *Bioinformatics* **33**, 605-607, doi:10.1093/bioinformatics/btw667 (2017).
- 5 Dronamraju, K. Profiles in genetics: Archibald E. Garrod (1857-1936). *Am J Hum Genet* **51**, 216-219 (1992).
- 6 Garrod, A. E. The Lancet. The incidence of alkaptonuria: a study in chemical individuality. *Nutr Rev* **33**, 81-83, doi:10.1111/j.1753-4887.1975.tb06025.x (1975).
- 7 Beadle, G. W. & Tatum, E. L. Genetic Control of Biochemical Reactions in Neurospora. *Proc Natl Acad Sci U S A* **27**, 499-506, doi:10.1073/pnas.27.11.499 (1941).
- 8 Tatum, E. L. A case history in biological research. *Science* **129**, 1711-1715, doi:10.1126/science.129.3365.1711 (1959).
- 9 Singer, M. & Berg, P. George Beadle: from genes to proteins. *Nat Rev Genet* **5**, 949-954, doi:10.1038/nrg1494 (2004).
- 10 Saudubray, J. M., Mochel, F., Lamari, F. & Garcia-Cazorla, A. Proposal for a simplified classification of IMD based on a pathophysiological approach: A practical guide for clinicians. *Journal of Inherited Metabolic Disease* **42**, 706-727, doi:10.1002/jimd.12086 (2019).
- 11 *International Classification of Inherited Metabolic Disorders*, <<http://www.icimd.org/>> (
- 12 Waters, D. et al. Global birth prevalence and mortality from inborn errors of metabolism: a systematic analysis of the evidence. *J Glob Health* **8**, 021102, doi:10.7189/jogh.08.021102 (2018).
- 13 Mak, C. M., Lee, H. C., Chan, A. Y. & Lam, C. W. Inborn errors of metabolism and expanded newborn screening: review and update. *Crit Rev Clin Lab Sci* **50**, 142-162, doi:10.3109/10408363.2013.847896 (2013).
- 14 Ortigoza-Escobar, J. D. A Proposed Diagnostic Algorithm for Inborn Errors of Metabolism Presenting With Movements Disorders. *Front Neurol* **11**, 582160, doi:10.3389/fneur.2020.582160 (2020).
- 15 De Duve, C., Pressman, B. C., Gianetto, R., Wattiaux, R. & Appelmans, F. Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem J* **60**, 604-617, doi:10.1042/bj0600604 (1955).
- 16 de Duve, C. The lysosome turns fifty. *Nat Cell Biol* **7**, 847-849, doi:10.1038/ncb0905-847 (2005).
- 17 De Duve, C., Berthet, J., Hers, H. G. & Dupret, L. [The hexose-phosphatase system. I. Existence of a specific glucose-6-phosphatase in liver]. *Bull Soc Chim Biol (Paris)* **31**, 1242-1253 (1949).
- 18 Claude, A. Fractionation of Mammalian Liver Cells by Differential Centrifugation : I. Problems, Methods, and Preparation of Extract. *J Exp Med* **84**, 51-59 (1946).
- 19 Claude, A. Fractionation of Mammalian Liver Cells by Differential Centrifugation : II. Experimental Procedures and Results. *J Exp Med* **84**, 61-89 (1946).
- 20 Hers, H. G., Berthet, J., Berthet, L. & De Duve, C. [The hexose-phosphatase system. III. Intracellular localization of enzymes by fractional centrifugation]. *Bull Soc Chim Biol (Paris)* **33**, 21-41 (1951).

- 21 Beaufay, H. & De Duve, C. [The hexosephosphatase system. VI. Attempted fractionation of microsomes containing glucose-6-phosphatase]. *Bull Soc Chim Biol (Paris)* **36**, 1551-1568 (1954).
- 22 Berthet, J. & De Duve, C. Tissue fractionation studies. I. The existence of a mitochondria-linked, enzymically inactive form of acid phosphatase in rat-liver tissue. *Biochem J* **50**, 174-181, doi:10.1042/bj0500174 (1951).
- 23 Berthet, J., Berthet, L., Appelmans, F. & De Duve, C. Tissue fractionation studies. II. The nature of the linkage between acid phosphatase and mitochondria in rat-liver tissue. *Biochem J* **50**, 182-189, doi:10.1042/bj0500182 (1951).
- 24 Appelmans, F., Wattiaux, R. & De Duve, C. Tissue fractionation studies. 5. The association of acid phosphatase with a special class of cytoplasmic granules in rat liver. *Biochem J* **59**, 438-445, doi:10.1042/bj0590438 (1955).
- 25 de, D. C., Berthet, J., Berthet, L. & Appelmans, F. Permeability of mitochondria. *Nature* **167**, 389-390, doi:10.1038/167389a0 (1951).
- 26 De Duve, C. & Baudhuin, P. Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol Rev* **46**, 323-357, doi:10.1152/physrev.1966.46.2.323 (1966).
- 27 Novikoff, A. B., Beaufay, H. & De Duve, C. Electron microscopy of lysosomerich fractions from rat liver. *J Biophys Biochem Cytol* **2**, 179-184 (1956).
- 28 Baudhuin, P., Beaufay, H. & De Duve, C. Combined biochemical and morphological study of particulate fractions from rat liver. Analysis of preparations enriched in lysosomes or in particles containing urate oxidase, D-amino acid oxidase, and catalase. *J Cell Biol* **26**, 219-243, doi:10.1083/jcb.26.1.219 (1965).
- 29 Ballabio, A. & Bonifacino, J. S. Lysosomes as dynamic regulators of cell and organismal homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **21**, 101-118, doi:10.1038/s41580-019-0185-4 (2020).
- 30 de Araujo, M. E. G., Liebscher, G., Hess, M. W. & Huber, L. A. Lysosomal size matters. *Traffic* **21**, 60-75, doi:10.1111/tra.12714 (2020).
- 31 Chapel, A. *et al.* An extended proteome map of the lysosomal membrane reveals novel potential transporters. *Mol Cell Proteomics* **12**, 1572-1588, doi:10.1074/mcp.M112.021980 (2013).
- 32 Schroder, B. *et al.* Integral and associated lysosomal membrane proteins. *Traffic* **8**, 1676-1686, doi:10.1111/j.1600-0854.2007.00643.x (2007).
- 33 Rudnik, S. & Damme, M. The lysosomal membrane-export of metabolites and beyond. *FEBS J* **288**, 4168-4182, doi:10.1111/febs.15602 (2021).
- 34 Casares, D., Escriba, P. V. & Rossello, C. A. Membrane Lipid Composition: Effect on Membrane and Organelle Structure, Function and Compartmentalization and Therapeutic Avenues. *Int J Mol Sci* **20**, doi:10.3390/ijms20092167 (2019).
- 35 Kolter, T. & Sandhoff, K. Principles of lysosomal membrane digestion: stimulation of sphingolipid degradation by sphingolipid activator proteins and anionic lysosomal lipids. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**, 81-103, doi:10.1146/annurev.cellbio.21.122303.120013 (2005).
- 36 Kobayashi, T. *et al.* A lipid associated with the antiphospholipid syndrome regulates endosome structure and function. *Nature* **392**, 193-197, doi:10.1038/32440 (1998).
- 37 Escriba, P. V. *et al.* Membrane lipid therapy: Modulation of the cell membrane composition and structure as a molecular base for drug discovery and new disease treatment. *Prog Lipid Res* **59**, 38-53, doi:10.1016/j.plipres.2015.04.003 (2015).
- 38 Ebner, M., Koch, P. A. & Haucke, V. Phosphoinositides in the control of lysosome function and homeostasis. *Biochem Soc Trans* **47**, 1173-1185, doi:10.1042/BST20190158 (2019).
- 39 Shin, H. R. & Zoncu, R. The Lysosome at the Intersection of Cellular Growth and Destruction. *Dev Cell* **54**, 226-238, doi:10.1016/j.devcel.2020.06.010 (2020).
- 40 Lamming, D. W. & Bar-Peled, L. Lysosome: The metabolic signaling hub. *Traffic* **20**, 27-38, doi:10.1111/tra.12617 (2019).
- 41 Li, S. C. & Kane, P. M. The yeast lysosome-like vacuole: endpoint and crossroads. *Biochim Biophys Acta* **1793**, 650-663, doi:10.1016/j.bbamcr.2008.08.003 (2009).

- 42 Marty, F. Plant vacuoles. *Plant Cell* **11**, 587-600, doi:10.1105/tpc.11.4.587 (1999).
- 43 Eskelinen, E. L. Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Mol Aspects Med* **27**, 495-502, doi:10.1016/j.mam.2006.08.005 (2006).
- 44 Wilke, S., Krausze, J. & Bussow, K. Crystal structure of the conserved domain of the DC lysosomal associated membrane protein: implications for the lysosomal glycoalyx. *BMC Biol* **10**, 62, doi:10.1186/1741-7007-10-62 (2012).
- 45 Hunziker, W., Simmen, T. & Honing, S. Trafficking of lysosomal membrane proteins in polarized kidney cells. *Nephrologie* **17**, 347-350 (1996).
- 46 Eskelinen, E. L. *et al.* Disturbed cholesterol traffic but normal proteolytic function in LAMP-1/LAMP-2 double-deficient fibroblasts. *Mol Biol Cell* **15**, 3132-3145, doi:10.1091/mbc.e04-02-0103 (2004).
- 47 Reczek, D. *et al.* LIMP-2 is a receptor for lysosomal mannose-6-phosphate-independent targeting of beta-glucocerebrosidase. *Cell* **131**, 770-783, doi:10.1016/j.cell.2007.10.018 (2007).
- 48 Gonzalez, A., Valeiras, M., Sidransky, E. & Tayebi, N. Lysosomal integral membrane protein-2: a new player in lysosome-related pathology. *Mol Genet Metab* **111**, 84-91, doi:10.1016/j.ymgme.2013.12.005 (2014).
- 49 Conrad, K. S. *et al.* Lysosomal integral membrane protein-2 as a phospholipid receptor revealed by biophysical and cellular studies. *Nat Commun* **8**, 1908, doi:10.1038/s41467-017-02044-8 (2017).
- 50 Neiss, W. F. A coat of glycoconjugates on the inner surface of the lysosomal membrane in the rat kidney. *Histochemistry* **80**, 603-608 (1984).
- 51 Reitsma, S., Slaaf, D. W., Vink, H., van Zandvoort, M. A. & oude Egbrink, M. G. The endothelial glycoalyx: composition, functions, and visualization. *Pflugers Arch* **454**, 345-359, doi:10.1007/s00424-007-0212-8 (2007).
- 52 Carlsson, S. R., Roth, J., Piller, F. & Fukuda, M. Isolation and characterization of human lysosomal membrane glycoproteins, h-lamp-1 and h-lamp-2. Major sialoglycoproteins carrying polylectosaminoglycan. *J Biol Chem* **263**, 18911-18919 (1988).
- 53 Henning, R. & Stoffel, W. Glycosphingolipids in lysosomal membranes. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **354**, 760-770, doi:10.1515/bchm2.1973.354.2.760 (1973).
- 54 Jezegou, A. *et al.* Heptahelical protein PQLC2 is a lysosomal cationic amino acid exporter underlying the action of cysteamine in cystinosis therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, E3434-3443, doi:10.1073/pnas.1211198109 (2012).
- 55 Sagne, C. *et al.* Identification and characterization of a lysosomal transporter for small neutral amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 7206-7211, doi:10.1073/pnas.121183498 (2001).
- 56 Wreden, C. C. *et al.* The H<sup>+</sup>-coupled electrogenic lysosomal amino acid transporter LYAAT1 localizes to the axon and plasma membrane of hippocampal neurons. *J Neurosci* **23**, 1265-1275, doi:10.1523/JNEUROSCI.23-04-01265.2003 (2003).
- 57 Hagglund, M. G. *et al.* Identification of SLC38A7 (SNAT7) protein as a glutamine transporter expressed in neurons. *J Biol Chem* **286**, 20500-20511, doi:10.1074/jbc.M110.162404 (2011).
- 58 Verdon, Q. *et al.* SNAT7 is the primary lysosomal glutamine exporter required for extracellular protein-dependent growth of cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, E3602-E3611, doi:10.1073/pnas.1617066114 (2017).
- 59 Yamashita, T. *et al.* Cloning and functional expression of a brain peptide/histidine transporter. *J Biol Chem* **272**, 10205-10211, doi:10.1074/jbc.272.15.10205 (1997).
- 60 Forster, S. & Lloyd, J. B. Solute translocation across the mammalian lysosome membrane. *Biochim Biophys Acta* **947**, 465-491, doi:10.1016/0304-4157(88)90004-4 (1988).
- 61 Bernar, J. *et al.* Characteristics of a lysosomal membrane transport system for tyrosine and other neutral amino acids in rat thyroid cells. *J Biol Chem* **261**, 17107-17112 (1986).
- 62 Mancini, G. M., Havelaar, A. C. & Verheijen, F. W. Lysosomal transport disorders. *J Inherit Metab Dis* **23**, 278-292, doi:10.1023/a:1005640214408 (2000).

- 63 Abu-Remaileh, M. *et al.* Lysosomal metabolomics reveals V-ATPase- and mTOR-dependent regulation of amino acid efflux from lysosomes. *Science* **358**, 807-813, doi:10.1126/science.aan6298 (2017).
- 64 Zhou, X., Thamotharan, M., Gangopadhyay, A., Serdikoff, C. & Adibi, S. A. Characterization of an oligopeptide transporter in renal lysosomes. *Biochim Biophys Acta* **1466**, 372-378, doi:10.1016/s0005-2736(00)00201-7 (2000).
- 65 Thamotharan, M., Lombardo, Y. B., Bawani, S. Z. & Adibi, S. A. An active mechanism for completion of the final stage of protein degradation in the liver, lysosomal transport of dipeptides. *J Biol Chem* **272**, 11786-11790, doi:10.1074/jbc.272.18.11786 (1997).
- 66 Wolters, J. C., Abele, R. & Tampe, R. Selective and ATP-dependent translocation of peptides by the homodimeric ATP binding cassette transporter TAP-like (ABCB9). *J Biol Chem* **280**, 23631-23636, doi:10.1074/jbc.M503231200 (2005).
- 67 Winchester, B. Lysosomal metabolism of glycoproteins. *Glycobiology* **15**, 1R-15R, doi:10.1093/glycob/cwi041 (2005).
- 68 Diril, M. K. *et al.* Lysosomal localization of GLUT8 in the testis--the EXXXLL motif of GLUT8 is sufficient for its intracellular sorting via AP1- and AP2-mediated interaction. *FEBS J* **276**, 3729-3743, doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07089.x (2009).
- 69 Schmidt, S., Joost, H. G. & Schurmann, A. GLUT8, the enigmatic intracellular hexose transporter. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **296**, E614-618, doi:10.1152/ajpendo.91019.2008 (2009).
- 70 Membrez, M. *et al.* GLUT8 is dispensable for embryonic development but influences hippocampal neurogenesis and heart function. *Mol Cell Biol* **26**, 4268-4276, doi:10.1128/MCB.00081-06 (2006).
- 71 Lim, J. A., Li, L. & Raben, N. Pompe disease: from pathophysiology to therapy and back again. *Front Aging Neurosci* **6**, 177, doi:10.3389/fnagi.2014.00177 (2014).
- 72 Trivedi, P. C., Bartlett, J. J. & Pulinilkunnil, T. Lysosomal Biology and Function: Modern View of Cellular Debris Bin. *Cells* **9**, doi:10.3390/cells9051131 (2020).
- 73 Fujiwara, Y., Wada, K. & Kabuta, T. Lysosomal degradation of intracellular nucleic acids--multiple autophagic pathways. *J Biochem* **161**, 145-154, doi:10.1093/jb/mvw085 (2017).
- 74 Fujiwara, Y. *et al.* Discovery of a novel type of autophagy targeting RNA. *Autophagy* **9**, 403-409, doi:10.4161/auto.23002 (2013).
- 75 Fujiwara, Y. *et al.* Direct uptake and degradation of DNA by lysosomes. *Autophagy* **9**, 1167-1171, doi:10.4161/auto.24880 (2013).
- 76 Lutgens, E. *et al.* Disruption of the cathepsin K gene reduces atherosclerosis progression and induces plaque fibrosis but accelerates macrophage foam cell formation. *Circulation* **113**, 98-107, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.561449 (2006).
- 77 Kitamoto, S. *et al.* Cathepsin L deficiency reduces diet-induced atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-knockout mice. *Circulation* **115**, 2065-2075, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.688523 (2007).
- 78 Hakala, J. K. *et al.* Lysosomal enzymes are released from cultured human macrophages, hydrolyze LDL in vitro, and are present extracellularly in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**, 1430-1436, doi:10.1161/01.ATV.0000077207.49221.06 (2003).
- 79 Zhao, C. F. & Herrington, D. M. The function of cathepsins B, D, and X in atherosclerosis. *Am J Cardiovasc Dis* **6**, 163-170 (2016).
- 80 Helske, S. *et al.* Possible role for mast cell-derived cathepsin G in the adverse remodelling of stenotic aortic valves. *Eur Heart J* **27**, 1495-1504, doi:10.1093/eurheartj/ehi706 (2006).
- 81 Felbor, U. *et al.* Neuronal loss and brain atrophy in mice lacking cathepsins B and L. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 7883-7888, doi:10.1073/pnas.112632299 (2002).
- 82 Authier, F., Metioui, M., Fabrega, S., Kouach, M. & Briand, G. Endosomal proteolysis of internalized insulin at the C-terminal region of the B chain by cathepsin D. *J Biol Chem* **277**, 9437-9446, doi:10.1074/jbc.M110188200 (2002).

- 83 Authier, F., Kouach, M. & Briand, G. Endosomal proteolysis of insulin-like growth factor-I at its C-terminal D-domain by cathepsin B. *FEBS Lett* **579**, 4309-4316, doi:10.1016/j.febslet.2005.06.066 (2005).
- 84 Kaminsky, V. & Zhivotovsky, B. Proteases in autophagy. *Biochim Biophys Acta* **1824**, 44-50, doi:10.1016/j.bbapap.2011.05.013 (2012).
- 85 Dubland, J. A. & Francis, G. A. Lysosomal acid lipase: at the crossroads of normal and atherogenic cholesterol metabolism. *Front Cell Dev Biol* **3**, 3, doi:10.3389/fcell.2015.00003 (2015).
- 86 Ouimet, M. *et al.* Autophagy regulates cholesterol efflux from macrophage foam cells via lysosomal acid lipase. *Cell Metab* **13**, 655-667, doi:10.1016/j.cmet.2011.03.023 (2011).
- 87 Jerome, W. G. Lysosomes, cholesterol and atherosclerosis. *Clin Lipidol* **5**, 853-865, doi:10.2217/clp.10.70 (2010).
- 88 Huang, S. C. *et al.* Cell-intrinsic lysosomal lipolysis is essential for alternative activation of macrophages. *Nat Immunol* **15**, 846-855, doi:10.1038/ni.2956 (2014).
- 89 Hanson, S. R., Best, M. D. & Wong, C. H. Sulfatases: structure, mechanism, biological activity, inhibition, and synthetic utility. *Angew Chem Int Ed Engl* **43**, 5736-5763, doi:10.1002/anie.200300632 (2004).
- 90 Sardiello, M., Annunziata, I., Roma, G. & Ballabio, A. Sulfatases and sulfatase modifying factors: an exclusive and promiscuous relationship. *Hum Mol Genet* **14**, 3203-3217, doi:10.1093/hmg/ddi351 (2005).
- 91 Woychik, N. A., Cardelli, J. A. & Dimond, R. L. A conformationally altered precursor to the lysosomal enzyme alpha-mannosidase accumulates in the endoplasmic reticulum in a mutant strain of *Dictyostelium discoideum*. *J Biol Chem* **261**, 9595-9602 (1986).
- 92 Ghosh, P., Dahms, N. M. & Kornfeld, S. Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 202-212, doi:10.1038/nrm1050 (2003).
- 93 Sachse, M., Urbe, S., Oorschot, V., Strous, G. J. & Klumperman, J. Bilayered clathrin coats on endosomal vacuoles are involved in protein sorting toward lysosomes. *Mol Biol Cell* **13**, 1313-1328, doi:10.1091/mbc.01-10-0525 (2002).
- 94 Doray, B., Ghosh, P., Griffith, J., Geuze, H. J. & Kornfeld, S. Cooperation of GGAs and AP-1 in packaging MPRs at the trans-Golgi network. *Science* **297**, 1700-1703, doi:10.1126/science.1075327 (2002).
- 95 Seaman, M. N. Cargo-selective endosomal sorting for retrieval to the Golgi requires retromer. *J Cell Biol* **165**, 111-122, doi:10.1083/jcb.200312034 (2004).
- 96 Wandinger-Ness, A. & Zerial, M. Rab proteins and the compartmentalization of the endosomal system. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **6**, a022616, doi:10.1101/cshperspect.a022616 (2014).
- 97 Hu, Y. B., Dammer, E. B., Ren, R. J. & Wang, G. The endosomal-lysosomal system: from acidification and cargo sorting to neurodegeneration. *Transl Neurodegener* **4**, 18, doi:10.1186/s40035-015-0041-1 (2015).
- 98 Braulke, T. & Bonifacino, J. S. Sorting of lysosomal proteins. *Biochim Biophys Acta* **1793**, 605-614, doi:10.1016/j.bbamcr.2008.10.016 (2009).
- 99 Rink, J., Ghigo, E., Kalaidzidis, Y. & Zerial, M. Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell* **122**, 735-749, doi:10.1016/j.cell.2005.06.043 (2005).
- 100 Melchionda, M., Pittman, J. K., Mayor, R. & Patel, S. Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> exchange by acidic organelles regulates cell migration in vivo. *J Cell Biol* **212**, 803-813, doi:10.1083/jcb.201510019 (2016).
- 101 Luzio, J. P., Pryor, P. R. & Bright, N. A. Lysosomes: fusion and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 622-632, doi:10.1038/nrm2217 (2007).
- 102 Luzio, J. P. *et al.* Membrane traffic to and from lysosomes. *Biochem Soc Symp*, 77-86, doi:10.1042/bss0720077 (2005).
- 103 Parton, R. G. *et al.* pH-induced microtubule-dependent redistribution of late endosomes in neuronal and epithelial cells. *J Cell Biol* **113**, 261-274, doi:10.1083/jcb.113.2.261 (1991).

- 104 Heuser, J. Changes in lysosome shape and distribution correlated with changes in  
cytoplasmic pH. *J Cell Biol* **108**, 855-864, doi:10.1083/jcb.108.3.855 (1989).
- 105 Zaarur, N. *et al.* Proteasome failure promotes positioning of lysosomes around the  
aggresome via local block of microtubule-dependent transport. *Mol Cell Biol* **34**, 1336-1348,  
doi:10.1128/MCB.00103-14 (2014).
- 106 Korolchuk, V. I. *et al.* Lysosomal positioning coordinates cellular nutrient responses. *Nat Cell  
Biol* **13**, 453-460, doi:10.1038/ncb2204 (2011).
- 107 Pu, J., Guardia, C. M., Keren-Kaplan, T. & Bonifacino, J. S. Mechanisms and functions of  
lysosome positioning. *J Cell Sci* **129**, 4329-4339, doi:10.1242/jcs.196287 (2016).
- 108 Bonifacino, J. S. & Neefjes, J. Moving and positioning the endolysosomal system. *Curr Opin  
Cell Biol* **47**, 1-8, doi:10.1016/j.ceb.2017.01.008 (2017).
- 109 Johnson, D. E., Ostrowski, P., Jaumouille, V. & Grinstein, S. The position of lysosomes within  
the cell determines their luminal pH. *J Cell Biol* **212**, 677-692, doi:10.1083/jcb.201507112  
(2016).
- 110 Lloyd-Evans, E. & Platt, F. M. Lysosomal Ca(2+) homeostasis: role in pathogenesis of  
lysosomal storage diseases. *Cell Calcium* **50**, 200-205, doi:10.1016/j.ceca.2011.03.010 (2011).
- 111 Mindell, J. A. Lysosomal acidification mechanisms. *Annu Rev Physiol* **74**, 69-86,  
doi:10.1146/annurev-physiol-012110-142317 (2012).
- 112 Wang, X. *et al.* TPC proteins are phosphoinositide- activated sodium-selective ion channels in  
endosomes and lysosomes. *Cell* **151**, 372-383, doi:10.1016/j.cell.2012.08.036 (2012).
- 113 Xiong, J. & Zhu, M. X. Regulation of lysosomal ion homeostasis by channels and transporters.  
*Sci China Life Sci* **59**, 777-791, doi:10.1007/s11427-016-5090-x (2016).
- 114 Hentze, M. W., Muckenthaler, M. U. & Andrews, N. C. Balancing acts: molecular control of  
mammalian iron metabolism. *Cell* **117**, 285-297, doi:10.1016/s0092-8674(04)00343-5 (2004).
- 115 Weber, R. A. *et al.* Maintaining Iron Homeostasis Is the Key Role of Lysosomal Acidity for Cell  
Proliferation. *Mol Cell* **77**, 645-655 e647, doi:10.1016/j.molcel.2020.01.003 (2020).
- 116 Kilpatrick, B. S., Eden, E. R., Schapira, A. H., Futter, C. E. & Patel, S. Direct mobilisation of  
lysosomal Ca<sup>2+</sup> triggers complex Ca<sup>2+</sup> signals. *J Cell Sci* **126**, 60-66, doi:10.1242/jcs.118836  
(2013).
- 117 Rocha, N. *et al.* Cholesterol sensor ORP1L contacts the ER protein VAP to control Rab7-RILP-  
p150 Glued and late endosome positioning. *J Cell Biol* **185**, 1209-1225,  
doi:10.1083/jcb.200811005 (2009).
- 118 Luo, J., Jiang, L., Yang, H. & Song, B. L. Routes and mechanisms of post-endosomal cholesterol  
trafficking: A story that never ends. *Traffic* **18**, 209-217, doi:10.1111/tra.12471 (2017).
- 119 Zong, X. *et al.* The two-pore channel TPCN2 mediates NAADP-dependent Ca(2+)-release from  
lysosomal stores. *Pflugers Arch* **458**, 891-899, doi:10.1007/s00424-009-0690-y (2009).
- 120 Morgan, A. J. *et al.* Bidirectional Ca(2+)(+) signaling occurs between the endoplasmic reticulum  
and acidic organelles. *J Cell Biol* **200**, 789-805, doi:10.1083/jcb.201204078 (2013).
- 121 Chen, Q. *et al.* Super-Resolution Tracking of Mitochondrial Dynamics with An Iridium(III)  
Luminophore. *Small* **14**, e1802166, doi:10.1002/sml.201802166 (2018).
- 122 Wong, Y. C., Ysselstein, D. & Krainc, D. Mitochondria-lysosome contacts regulate  
mitochondrial fission via RAB7 GTP hydrolysis. *Nature* **554**, 382-386,  
doi:10.1038/nature25486 (2018).
- 123 Wong, Y. C., Kim, S., Peng, W. & Krainc, D. Regulation and Function of Mitochondria-  
Lysosome Membrane Contact Sites in Cellular Homeostasis. *Trends Cell Biol* **29**, 500-513,  
doi:10.1016/j.tcb.2019.02.004 (2019).
- 124 Zhang, X. *et al.* MCOLN1 is a ROS sensor in lysosomes that regulates autophagy. *Nat Commun*  
**7**, 12109, doi:10.1038/ncomms12109 (2016).
- 125 Renard, H. F., Johannes, L. & Morsomme, P. Increasing Diversity of Biological Membrane  
Fission Mechanisms. *Trends Cell Biol* **28**, 274-286, doi:10.1016/j.tcb.2017.12.001 (2018).
- 126 Saffi, G. T. & Botelho, R. J. Lysosome Fission: Planning for an Exit. *Trends Cell Biol* **29**, 635-  
646, doi:10.1016/j.tcb.2019.05.003 (2019).

- 127 Chen, Y. & Yu, L. Autophagic lysosome reformation. *Exp Cell Res* **319**, 142-146,  
doi:10.1016/j.yexcr.2012.09.004 (2013).
- 128 Yu, L. *et al.* Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR.  
*Nature* **465**, 942-946, doi:10.1038/nature09076 (2010).
- 129 Chen, D. *et al.* Retromer is required for apoptotic cell clearance by phagocytic receptor  
recycling. *Science* **327**, 1261-1264, doi:10.1126/science.1184840 (2010).
- 130 Bright, N. A., Davis, L. J. & Luzio, J. P. Endolysosomes Are the Principal Intracellular Sites of  
Acid Hydrolase Activity. *Curr Biol* **26**, 2233-2245, doi:10.1016/j.cub.2016.06.046 (2016).
- 131 Cinque, L. *et al.* MiT/TFE factors control ER-phagy via transcriptional regulation of FAM134B.  
*EMBO J* **39**, e105696, doi:10.15252/embj.2020105696 (2020).
- 132 Maejima, I. *et al.* Autophagy sequesters damaged lysosomes to control lysosomal biogenesis  
and kidney injury. *EMBO J* **32**, 2336-2347, doi:10.1038/emboj.2013.171 (2013).
- 133 Pickles, S., Vigie, P. & Youle, R. J. Mitophagy and Quality Control Mechanisms in  
Mitochondrial Maintenance. *Curr Biol* **28**, R170-R185, doi:10.1016/j.cub.2018.01.004 (2018).
- 134 Singh, R. & Cuervo, A. M. Autophagy in the cellular energetic balance. *Cell Metab* **13**, 495-  
504, doi:10.1016/j.cmet.2011.04.004 (2011).
- 135 Nakatogawa, H. & Mochida, K. Reticulophagy and nucleophagy: New findings and unsolved  
issues. *Autophagy* **11**, 2377-2378, doi:10.1080/15548627.2015.1106665 (2015).
- 136 Jin, S. M. & Youle, R. J. PINK1- and Parkin-mediated mitophagy at a glance. *J Cell Sci* **125**, 795-  
799, doi:10.1242/jcs.093849 (2012).
- 137 Oku, M. & Sakai, Y. Peroxisomes as dynamic organelles: autophagic degradation. *FEBS J* **277**,  
3289-3294, doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07741.x (2010).
- 138 Papadopoulos, C., Kravic, B. & Meyer, H. Repair or Lysophagy: Dealing with Damaged  
Lysosomes. *J Mol Biol* **432**, 231-239, doi:10.1016/j.jmb.2019.08.010 (2020).
- 139 Radulovic, M. *et al.* ESCRT-mediated lysosome repair precedes lysophagy and promotes cell  
survival. *EMBO J* **37**, doi:10.15252/embj.201899753 (2018).
- 140 Arias, E. & Cuervo, A. M. Chaperone-mediated autophagy in protein quality control. *Curr  
Opin Cell Biol* **23**, 184-189, doi:10.1016/j.ceb.2010.10.009 (2011).
- 141 Patel, B. & Cuervo, A. M. Methods to study chaperone-mediated autophagy. *Methods* **75**,  
133-140, doi:10.1016/j.ymeth.2015.01.003 (2015).
- 142 Kaushik, S. & Cuervo, A. M. The coming of age of chaperone-mediated autophagy. *Nat Rev  
Mol Cell Biol* **19**, 365-381, doi:10.1038/s41580-018-0001-6 (2018).
- 143 Mullock, B. M., Branch, W. J., van Schaik, M., Gilbert, L. K. & Luzio, J. P. Reconstitution of an  
endosome-lysosome interaction in a cell-free system. *J Cell Biol* **108**, 2093-2099,  
doi:10.1083/jcb.108.6.2093 (1989).
- 144 Parzych, K. R. & Klionsky, D. J. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and  
regulation. *Antioxid Redox Signal* **20**, 460-473, doi:10.1089/ars.2013.5371 (2014).
- 145 Morelli, A. E. *et al.* Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic  
cells. *Blood* **104**, 3257-3266, doi:10.1182/blood-2004-03-0824 (2004).
- 146 Bright, N. A., Gratian, M. J. & Luzio, J. P. Endocytic delivery to lysosomes mediated by  
concurrent fusion and kissing events in living cells. *Curr Biol* **15**, 360-365,  
doi:10.1016/j.cub.2005.01.049 (2005).
- 147 Yang, C. & Wang, X. Lysosome biogenesis: Regulation and functions. *J Cell Biol* **220**,  
doi:10.1083/jcb.202102001 (2021).
- 148 Liu, B., Du, H., Rutkowski, R., Gartner, A. & Wang, X. LAAT-1 is the lysosomal lysine/arginine  
transporter that maintains amino acid homeostasis. *Science* **337**, 351-354,  
doi:10.1126/science.1220281 (2012).
- 149 Perera, R. M. & Zoncu, R. The Lysosome as a Regulatory Hub. *Annu Rev Cell Dev Biol* **32**, 223-  
253, doi:10.1146/annurev-cellbio-111315-125125 (2016).
- 150 Mahapatra, K. K. *et al.* The lysosome as an imperative regulator of autophagy and cell death.  
*Cell Mol Life Sci* **78**, 7435-7449, doi:10.1007/s00018-021-03988-3 (2021).

- 151 Andrews, N. W., Almeida, P. E. & Corrotte, M. Damage control: cellular mechanisms of  
plasma membrane repair. *Trends Cell Biol* **24**, 734-742, doi:10.1016/j.tcb.2014.07.008 (2014).
- 152 Saxton, R. A. & Sabatini, D. M. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* **169**,  
361-371, doi:10.1016/j.cell.2017.03.035 (2017).
- 153 Sancak, Y. *et al.* Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is  
necessary for its activation by amino acids. *Cell* **141**, 290-303, doi:10.1016/j.cell.2010.02.024  
(2010).
- 154 Morgan, A. J., Platt, F. M., Lloyd-Evans, E. & Galione, A. Molecular mechanisms of  
endolysosomal Ca<sup>2+</sup> signalling in health and disease. *Biochem J* **439**, 349-374,  
doi:10.1042/BJ20110949 (2011).
- 155 Li, P., Gu, M. & Xu, H. Lysosomal Ion Channels as Decoders of Cellular Signals. *Trends*  
*Biochem Sci* **44**, 110-124, doi:10.1016/j.tibs.2018.10.006 (2019).
- 156 Cheng, X., Shen, D., Samie, M. & Xu, H. Mucolipins: Intracellular TRPML1-3 channels. *FEBS*  
*Lett* **584**, 2013-2021, doi:10.1016/j.febslet.2009.12.056 (2010).
- 157 Medina, D. L. *et al.* Lysosomal calcium signalling regulates autophagy through calcineurin and  
TFEB. *Nat Cell Biol* **17**, 288-299, doi:10.1038/ncb3114 (2015).
- 158 Dong, X. P. *et al.* PI(3,5)P(2) controls membrane trafficking by direct activation of mucolipin  
Ca(2+) release channels in the endolysosome. *Nat Commun* **1**, 38, doi:10.1038/ncomms1037  
(2010).
- 159 Aits, S. & Jaattela, M. Lysosomal cell death at a glance. *J Cell Sci* **126**, 1905-1912,  
doi:10.1242/jcs.091181 (2013).
- 160 Vanden Berghe, T. *et al.* Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar  
cellular disintegration features. *Cell Death Differ* **17**, 922-930, doi:10.1038/cdd.2009.184  
(2010).
- 161 Papadopoulos, C. & Meyer, H. Detection and Clearance of Damaged Lysosomes by the Endo-  
Lysosomal Damage Response and Lysophagy. *Curr Biol* **27**, R1330-R1341,  
doi:10.1016/j.cub.2017.11.012 (2017).
- 162 Matz, K. M., Guzman, R. M. & Goodman, A. G. The Role of Nucleic Acid Sensing in Controlling  
Microbial and Autoimmune Disorders. *Int Rev Cell Mol Biol* **345**, 35-136,  
doi:10.1016/bs.ircmb.2018.08.002 (2019).
- 163 Majer, O., Liu, B. & Barton, G. M. Nucleic acid-sensing TLRs: trafficking and regulation. *Curr*  
*Opin Immunol* **44**, 26-33, doi:10.1016/j.coi.2016.10.003 (2017).
- 164 Andrews, N. W. Lysosomes and the plasma membrane: trypanosomes reveal a secret  
relationship. *J Cell Biol* **158**, 389-394, doi:10.1083/jcb.200205110 (2002).
- 165 Reddy, A., Caler, E. V. & Andrews, N. W. Plasma membrane repair is mediated by Ca(2+)-  
regulated exocytosis of lysosomes. *Cell* **106**, 157-169, doi:10.1016/s0092-8674(01)00421-4  
(2001).
- 166 Tam, C. *et al.* Exocytosis of acid sphingomyelinase by wounded cells promotes endocytosis  
and plasma membrane repair. *J Cell Biol* **189**, 1027-1038, doi:10.1083/jcb.201003053 (2010).
- 167 Idone, V. *et al.* Repair of injured plasma membrane by rapid Ca<sup>2+</sup>-dependent endocytosis. *J*  
*Cell Biol* **180**, 905-914, doi:10.1083/jcb.200708010 (2008).
- 168 Sardiello, M. *et al.* A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science* **325**,  
473-477, doi:10.1126/science.1174447 (2009).
- 169 Settembre, C. *et al.* TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. *Science* **332**, 1429-1433,  
doi:10.1126/science.1204592 (2011).
- 170 Palmieri, M. *et al.* Characterization of the CLEAR network reveals an integrated control of  
cellular clearance pathways. *Hum Mol Genet* **20**, 3852-3866, doi:10.1093/hmg/ddr306  
(2011).
- 171 Medina, D. L. *et al.* Transcriptional activation of lysosomal exocytosis promotes cellular  
clearance. *Dev Cell* **21**, 421-430, doi:10.1016/j.devcel.2011.07.016 (2011).

- 172 Willett, R. *et al.* TFEB regulates lysosomal positioning by modulating TMEM55B expression and JIP4 recruitment to lysosomes. *Nat Commun* **8**, 1580, doi:10.1038/s41467-017-01871-z (2017).
- 173 Martina, J. A., Diab, H. I., Brady, O. A. & Puertollano, R. TFEB and TFE3 are novel components of the integrated stress response. *EMBO J* **35**, 479-495, doi:10.15252/embj.201593428 (2016).
- 174 Visvikis, O. *et al.* Innate host defense requires TFEB-mediated transcription of cytoprotective and antimicrobial genes. *Immunity* **40**, 896-909, doi:10.1016/j.immuni.2014.05.002 (2014).
- 175 Pastore, N. *et al.* TFEB and TFE3 cooperate in the regulation of the innate immune response in activated macrophages. *Autophagy* **12**, 1240-1258, doi:10.1080/15548627.2016.1179405 (2016).
- 176 Martina, J. A. & Puertollano, R. Protein phosphatase 2A stimulates activation of TFEB and TFE3 transcription factors in response to oxidative stress. *J Biol Chem* **293**, 12525-12534, doi:10.1074/jbc.RA118.003471 (2018).
- 177 Nezich, C. L., Wang, C., Fogel, A. I. & Youle, R. J. MiT/TFE transcription factors are activated during mitophagy downstream of Parkin and Atg5. *J Cell Biol* **210**, 435-450, doi:10.1083/jcb.201501002 (2015).
- 178 Puertollano, R., Ferguson, S. M., Brugarolas, J. & Ballabio, A. The complex relationship between TFEB transcription factor phosphorylation and subcellular localization. *EMBO J* **37**, doi:10.15252/embj.201798804 (2018).
- 179 Sha, Y., Rao, L., Settembre, C., Ballabio, A. & Eissa, N. T. STUB1 regulates TFEB-induced autophagy-lysosome pathway. *EMBO J* **36**, 2544-2552, doi:10.15252/embj.201796699 (2017).
- 180 Sakamaki, J. I. *et al.* Bromodomain Protein BRD4 Is a Transcriptional Repressor of Autophagy and Lysosomal Function. *Mol Cell* **66**, 517-532 e519, doi:10.1016/j.molcel.2017.04.027 (2017).
- 181 Kreuzaler, P. A. *et al.* Stat3 controls lysosomal-mediated cell death in vivo. *Nat Cell Biol* **13**, 303-309, doi:10.1038/ncb2171 (2011).
- 182 Shin, H. J. *et al.* AMPK-SKP2-CARM1 signalling cascade in transcriptional regulation of autophagy. *Nature* **534**, 553-557, doi:10.1038/nature18014 (2016).
- 183 Lawrence, R. E. & Zoncu, R. The lysosome as a cellular centre for signalling, metabolism and quality control. *Nat Cell Biol* **21**, 133-142, doi:10.1038/s41556-018-0244-7 (2019).
- 184 Barral, D. C. *et al.* Current methods to analyze lysosome morphology, positioning, motility and function. *Traffic* **23**, 238-269, doi:10.1111/tra.12839 (2022).
- 185 Fraldi, A., Klein, A. D., Medina, D. L. & Settembre, C. Brain Disorders Due to Lysosomal Dysfunction. *Annu Rev Neurosci* **39**, 277-295, doi:10.1146/annurev-neuro-070815-014031 (2016).
- 186 Nixon, R. A. The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nat Med* **19**, 983-997, doi:10.1038/nm.3232 (2013).
- 187 Kimmelman, A. C. & White, E. Autophagy and Tumor Metabolism. *Cell Metab* **25**, 1037-1043, doi:10.1016/j.cmet.2017.04.004 (2017).
- 188 Perera, R. M., Di Malta, C. & Ballabio, A. MiT/TFE Family of Transcription Factors, Lysosomes, and Cancer. *Annu Rev Cancer Biol* **3**, 203-222, doi:10.1146/annurev-cancerbio-030518-055835 (2019).
- 189 Meszaros, G., Pasquier, A., Vivot, K., Goginashvili, A. & Ricci, R. Lysosomes in nutrient signalling: A focus on pancreatic beta-cells. *Diabetes Obes Metab* **20 Suppl 2**, 104-115, doi:10.1111/dom.13389 (2018).
- 190 Hers, H. G. alpha-Glucosidase deficiency in generalized glycogenstorage disease (Pompe's disease). *Biochem J* **86**, 11-16, doi:10.1042/bj0860011 (1963).
- 191 Lejeune, N., Thines-Sempoux, D. & Hers, H. G. Tissue fractionation studies. 16. Intracellular distribution and properties of alpha-glucosidases in rat liver. *Biochem J* **86**, 16-21, doi:10.1042/bj0860016 (1963).

- 192 Baudhuin, P., Hers, H. G. & Loeb, H. An Electron Microscopic and Biochemical Study of Type II  
Glycogenosis. *Lab Invest* **13**, 1139-1152 (1964).
- 193 Hers, H. G. Inborn Lysosomal Diseases. *Gastroenterology* **48**, 625-633 (1965).
- 194 Hers, H. G. & Van Hoof, F. *Metabolic Diseases: Lysosomes and Storage Diseases*. 666  
(Academic Press, 1973).
- 195 Parenti, G., Medina, D. L. & Ballabio, A. The rapidly evolving view of lysosomal storage  
diseases. *EMBO Mol Med* **13**, e12836, doi:10.15252/emmm.202012836 (2021).
- 196 Meikle, P. J., Hopwood, J. J., Clague, A. E. & Carey, W. F. Prevalence of lysosomal storage  
disorders. *JAMA* **281**, 249-254, doi:10.1001/jama.281.3.249 (1999).
- 197 Nita, D. A., Mole, S. E. & Minassian, B. A. Neuronal ceroid lipofuscinoses. *Epileptic Disord* **18**,  
73-88, doi:10.1684/epd.2016.0844 (2016).
- 198 Aronson, N. N., Jr. Aspartylglycosaminuria: biochemistry and molecular biology. *Biochim  
Biophys Acta* **1455**, 139-154, doi:10.1016/s0925-4439(99)00076-9 (1999).
- 199 Witkop, C. J. *et al.* Albinism and Hermansky-Pudlak syndrome in Puerto Rico. *Bol Asoc Med P  
R* **82**, 333-339 (1990).
- 200 Platt, F. M., d'Azzo, A., Davidson, B. L., Neufeld, E. F. & Tiffet, C. J. Lysosomal storage diseases.  
**4**, doi:10.1038/s41572-018-0025-4 (2018).
- 201 Grabowski, G. A. Overview of Inflammation in Neurometabolic Diseases. *Semin Pediatr  
Neurol* **24**, 207-213, doi:10.1016/j.spen.2017.08.005 (2017).
- 202 Rigante, D., Cipolla, C., Basile, U., Gulli, F. & Savastano, M. C. Overview of immune  
abnormalities in lysosomal storage disorders. *Immunol Lett* **188**, 79-85,  
doi:10.1016/j.imlet.2017.07.004 (2017).
- 203 Vitner, E. B., Platt, F. M. & Futerman, A. H. Common and uncommon pathogenic cascades in  
lysosomal storage diseases. *J Biol Chem* **285**, 20423-20427, doi:10.1074/jbc.R110.134452  
(2010).
- 204 Bell, C. J. *et al.* Carrier testing for severe childhood recessive diseases by next-generation  
sequencing. *Sci Transl Med* **3**, 65ra64, doi:10.1126/scitranslmed.3001756 (2011).
- 205 Jarvinen, O. *et al.* A retrospective study of long-term psychosocial consequences and  
satisfaction after carrier testing in childhood in an autosomal recessive disease:  
aspartylglucosaminuria. *Clin Genet* **58**, 447-454, doi:10.1034/j.1399-0004.2000.580604.x  
(2000).
- 206 Chiang, S. C., Hwu, W. L., Lee, N. C., Hsu, L. W. & Chien, Y. H. Algorithm for Pompe disease  
newborn screening: results from the Taiwan screening program. *Mol Genet Metab* **106**, 281-  
286, doi:10.1016/j.ymgme.2012.04.013 (2012).
- 207 Hwu, W. L. *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* **30**, 1397-1405,  
doi:10.1002/humu.21074 (2009).
- 208 Jansen, M. E., Klein, A. W., Buitenhuis, E. C., Rodenburg, W. & Cornel, M. C. Expanded  
Neonatal Bloodspot Screening Programmes: An Evaluation Framework to Discuss New  
Conditions With Stakeholders. *Front Pediatr* **9**, 635353, doi:10.3389/fped.2021.635353  
(2021).
- 209 Gelb, M. H. 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**, doi:10.3390/ijns4030023 (2018).
- 210 Labrousse, P. *et al.* Genetic heterozygosity and pseudodeficiency in the Pompe disease  
newborn screening pilot program. *Mol Genet Metab* **99**, 379-383,  
doi:10.1016/j.ymgme.2009.12.014 (2010).
- 211 Peck, D. S. *et al.* Incorporation of Second-Tier Biomarker Testing Improves the Specificity of  
Newborn Screening for Mucopolysaccharidosis Type I. *Int J Neonatal Screen* **6**, 10,  
doi:10.3390/ijns6010010 (2020).
- 212 Sly, W. S., Kaplan, A., Achord, D. T., Brot, F. E. & Bell, C. E. Receptor-mediated uptake of  
lysosomal enzymes. *Prog Clin Biol Res* **23**, 547-551 (1978).

- 213 Sands, M. S. & Davidson, B. L. Gene therapy for lysosomal storage diseases. *Mol Ther* **13**, 839-849, doi:10.1016/j.ymthe.2006.01.006 (2006).
- 214 Neufeld, E. F. From serendipity to therapy. *Annu Rev Biochem* **80**, 1-15, doi:10.1146/annurev.biochem.031209.093756 (2011).
- 215 Markham, A. Cerliponase Alfa: First Global Approval. *Drugs* **77**, 1247-1249, doi:10.1007/s40265-017-0771-8 (2017).
- 216 Broomfield, A., Jones, S. A., Hughes, S. M. & Bigger, B. W. The impact of the immune system on the safety and efficiency of enzyme replacement therapy in lysosomal storage disorders. *J Inherit Metab Dis* **39**, 499-512, doi:10.1007/s10545-016-9917-1 (2016).
- 217 Afroze, B. & Brown, N. Ethical issues in managing Lysosomal storage disorders in children in low and middle income countries. *Pak J Med Sci* **33**, 1036-1041, doi:10.12669/pjms.334.12975 (2017).
- 218 Shayman, J. A. ELIGLUSTAT TARTRATE: Glucosylceramide Synthase Inhibitor Treatment of Type 1 Gaucher Disease. *Drugs Future* **35**, 613-620 (2010).
- 219 Platt, F. M., Neises, G. R., Dwek, R. A. & Butters, T. D. N-butyldeoxynojirimycin is a novel inhibitor of glycolipid biosynthesis. *J Biol Chem* **269**, 8362-8365 (1994).
- 220 Parenti, G., Andria, G. & Valenzano, K. J. Pharmacological Chaperone Therapy: Preclinical Development, Clinical Translation, and Prospects for the Treatment of Lysosomal Storage Disorders. *Mol Ther* **23**, 1138-1148, doi:10.1038/mt.2015.62 (2015).
- 221 Hobbs, J. R. *et al.* Reversal of clinical features of Hurler's disease and biochemical improvement after treatment by bone-marrow transplantation. *Lancet* **2**, 709-712, doi:10.1016/s0140-6736(81)91046-1 (1981).
- 222 Huang, I. C. *et al.* Quality of life information and trust in physicians among families of children with life-limiting conditions. *Patient Relat Outcome Meas* **2010**, 141-148, doi:10.2147/prom.s12564 (2010).
- 223 Somanadhan, S. & Larkin, P. J. Parents' experiences of living with, and caring for children, adolescents and young adults with Mucopolysaccharidosis (MPS). *Orphanet J Rare Dis* **11**, 138, doi:10.1186/s13023-016-0521-0 (2016).
- 224 Kirkegaard, T. *et al.* Heat shock protein-based therapy as a potential candidate for treating the sphingolipidoses. *Sci Transl Med* **8**, 355ra118, doi:10.1126/scitranslmed.aad9823 (2016).
- 225 Keeling, K. M., Xue, X., Gunn, G. & Bedwell, D. M. Therapeutics based on stop codon readthrough. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **15**, 371-394, doi:10.1146/annurev-genom-091212-153527 (2014).
- 226 Ory, D. S. *et al.* Intrathecal 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin decreases neurological disease progression in Niemann-Pick disease, type C1: a non-randomised, open-label, phase 1-2 trial. *Lancet* **390**, 1758-1768, doi:10.1016/S0140-6736(17)31465-4 (2017).
- 227 Spiegel, S. & Milstien, S. Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 397-407, doi:10.1038/nrm1103 (2003).
- 228 Merrill, A. H., Jr. Characterization of serine palmitoyltransferase activity in Chinese hamster ovary cells. *Biochim Biophys Acta* **754**, 284-291, doi:10.1016/0005-2760(83)90144-3 (1983).
- 229 Merrill, A. H., Jr. & Williams, R. D. Utilization of different fatty acyl-CoA thioesters by serine palmitoyltransferase from rat brain. *J Lipid Res* **25**, 185-188 (1984).
- 230 Zitomer, N. C. *et al.* Ceramide synthase inhibition by fumonisin B1 causes accumulation of 1-deoxysphinganine: a novel category of bioactive 1-deoxysphingoid bases and 1-deoxydihydroceramides biosynthesized by mammalian cell lines and animals. *J Biol Chem* **284**, 4786-4795, doi:10.1074/jbc.M808798200 (2009).
- 231 Pruetz, S. T. *et al.* Biodiversity of sphingoid bases ("sphingosines") and related amino alcohols. *J Lipid Res* **49**, 1621-1639, doi:10.1194/jlr.R800012-JLR200 (2008).
- 232 Pewzner-Jung, Y., Ben-Dor, S. & Futerman, A. H. When do Lasses (longevity assurance genes) become CerS (ceramide synthases)? Insights into the regulation of ceramide synthesis. *J Biol Chem* **281**, 25001-25005, doi:10.1074/jbc.R600010200 (2006).

- 233 Causeret, C., Geeraert, L., Van der Hoeven, G., Mannaerts, G. P. & Van Veldhoven, P. P. Further characterization of rat dihydroceramide desaturase: tissue distribution, subcellular localization, and substrate specificity. *Lipids* **35**, 1117-1125, doi:10.1007/s11745-000-0627-6 (2000).
- 234 Hannun, Y. A. & Obeid, L. M. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 139-150, doi:10.1038/nrm2329 (2008).
- 235 Laquerriere, A., Bekri, S., Suzuki, K. & Harding, B. N. in *Developmental Neuropathology* (eds H. Adle-Biassette, B.N. Harding, & J. Golden) Ch. Chapter 29, 313-367 (John Wiley & Sons, Ltd., 2018).
- 236 Dunn, T. M., Tiffit, C. J. & Proia, R. L. A perilous path: the inborn errors of sphingolipid metabolism. *J Lipid Res* **60**, 475-483, doi:10.1194/jlr.S091827 (2019).
- 237 Snider, J. M., Luberto, C. & Hannun, Y. A. Approaches for probing and evaluating mammalian sphingolipid metabolism. *Anal Biochem* **575**, 70-86, doi:10.1016/j.ab.2019.03.014 (2019).
- 238 Hannun, Y. A. & Obeid, L. M. The Ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind. *J Biol Chem* **277**, 25847-25850, doi:10.1074/jbc.R200008200 (2002).
- 239 Hetz, C. A. *et al.* Caspase-dependent initiation of apoptosis and necrosis by the Fas receptor in lymphoid cells: onset of necrosis is associated with delayed ceramide increase. *J Cell Sci* **115**, 4671-4683, doi:10.1242/jcs.00153 (2002).
- 240 Snider, A. J., Orr Gandy, K. A. & Obeid, L. M. Sphingosine kinase: Role in regulation of bioactive sphingolipid mediators in inflammation. *Biochimie* **92**, 707-715, doi:10.1016/j.biochi.2010.02.008 (2010).
- 241 Lavieu, G. *et al.* Regulation of autophagy by sphingosine kinase 1 and its role in cell survival during nutrient starvation. *J Biol Chem* **281**, 8518-8527, doi:10.1074/jbc.M506182200 (2006).
- 242 Venable, M. E., Lee, J. Y., Smyth, M. J., Bielawska, A. & Obeid, L. M. Role of ceramide in cellular senescence. *J Biol Chem* **270**, 30701-30708, doi:10.1074/jbc.270.51.30701 (1995).
- 243 Futerman, A. H. Intracellular trafficking of sphingolipids: relationship to biosynthesis. *Biochim Biophys Acta* **1758**, 1885-1892, doi:10.1016/j.bbamem.2006.08.004 (2006).
- 244 van Meer, G. & Lisman, Q. Sphingolipid transport: rafts and translocators. *J Biol Chem* **277**, 25855-25858, doi:10.1074/jbc.R200010200 (2002).
- 245 Shaimardanova, A. A., Solovyeva, V. V., Issa, S. S. & Rizvanov, A. A. Gene Therapy of Sphingolipid Metabolic Disorders. *Int J Mol Sci* **24**, doi:10.3390/ijms24043627 (2023).
- 246 in *Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS* (eds A. Mehta, M. Beck, & G. Sunder-Plassmann) (2006).
- 247 Anderson, W. A case of "angeio-keratoma". *British Journal of Dermatology* **10**, 113-117, doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1898.tb16317.x> (1898).
- 248 Fabry, J. Ein Beitrag zur Kenntniss der Purpura haemorrhagica nodularis (Purpura papulosa haemorrhagica Hebrae). *Archiv für Dermatologie und Syphilis* **43**, 187-200 (1898).
- 249 Fabry, H. Angiokeratoma corporis diffusum--Fabry disease: historical review from the original description to the introduction of enzyme replacement therapy. *Acta Paediatr Suppl* **91**, 3-5, doi:10.1111/j.1651-2227.2002.tb03102.x (2002).
- 250 Desnick, R. J. *et al.* Fabry disease, an under-recognized multisystemic disorder: expert recommendations for diagnosis, management, and enzyme replacement therapy. *Ann Intern Med* **138**, 338-346, doi:10.7326/0003-4819-138-4-200302180-00014 (2003).
- 251 Germain, D. P. Fabry disease. *Orphanet J Rare Dis* **5**, 30, doi:10.1186/1750-1172-5-30 (2010).
- 252 Wilcox, W. R. *et al.* Females with Fabry disease frequently have major organ involvement: lessons from the Fabry Registry. *Mol Genet Metab* **93**, 112-128, doi:10.1016/j.ymgme.2007.09.013 (2008).
- 253 Orstavik, K. H. X chromosome inactivation in clinical practice. *Hum Genet* **126**, 363-373, doi:10.1007/s00439-009-0670-5 (2009).

- 254 Pugacheva, E. M. *et al.* Familial cases of point mutations in the XIST promoter reveal a correlation between CTCF binding and pre-emptive choices of X chromosome inactivation. *Hum Mol Genet* **14**, 953-965, doi:10.1093/hmg/ddi089 (2005).
- 255 Plenge, R. M. *et al.* A promoter mutation in the XIST gene in two unrelated families with skewed X-chromosome inactivation. *Nat Genet* **17**, 353-356, doi:10.1038/ng1197-353 (1997).
- 256 Knudsen, G. P., Pedersen, J., Klingenberg, O., Lygren, I. & Orstavik, K. H. Increased skewing of X chromosome inactivation with age in both blood and buccal cells. *Cytogenet Genome Res* **116**, 24-28, doi:10.1159/000097414 (2007).
- 257 Sharp, A., Robinson, D. & Jacobs, P. Age- and tissue-specific variation of X chromosome inactivation ratios in normal women. *Hum Genet* **107**, 343-349, doi:10.1007/s004390000382 (2000).
- 258 Viggiano, E. & Politano, L. X Chromosome Inactivation in Carriers of Fabry Disease: Review and Meta-Analysis. *Int J Mol Sci* **22**, doi:10.3390/ijms22147663 (2021).
- 259 Eng, C. M. & Desnick, R. J. Molecular basis of Fabry disease: mutations and polymorphisms in the human alpha-galactosidase A gene. *Hum Mutat* **3**, 103-111, doi:10.1002/humu.1380030204 (1994).
- 260 Richards, S. *et al.* Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine* **17**, 405-424, doi:10.1038/gim.2015.30 (2015).
- 261 Germain, D. P. *et al.* Challenging the traditional approach for interpreting genetic variants: Lessons from Fabry disease. *Clin Genet* **101**, 390-402, doi:10.1111/cge.14102 (2022).
- 262 Liang, K. H. *et al.* The Fabry disease-causing mutation, GLA IVS4+919G>A, originated in Mainland China more than 800 years ago. *J Hum Genet* **65**, 619-625, doi:10.1038/s10038-020-0745-7 (2020).
- 263 Ortiz, A. *et al.* Fabry disease revisited: Management and treatment recommendations for adult patients. *Mol Genet Metab* **123**, 416-427, doi:10.1016/j.ymgme.2018.02.014 (2018).
- 264 Gagnaniello, V. *et al.* Newborn Screening for Fabry Disease: Current Status of Knowledge. *Int J Neonatal Screen* **9**, doi:10.3390/ijns9020031 (2023).
- 265 Guce, A. I. & Garman, S. C. in *Fabry Disease* (eds D. Elstein, G. Altarescu, & M. Beck) 21-38 (Springer, Dordrecht, 2010).
- 266 Guce, A. I. *et al.* Catalytic mechanism of human alpha-galactosidase. *J Biol Chem* **285**, 3625-3632, doi:10.1074/jbc.M109.060145 (2010).
- 267 Hulkova, H. *et al.* [Postmortem diagnosis of Fabry disease in a female heterozygote leading to the detection of undiagnosed manifest disease in the family]. *Cas Lek Cesk* **138**, 660-664 (1999).
- 268 Laney, D. A. *et al.* Fabry disease in infancy and early childhood: a systematic literature review. *Genet Med* **17**, 323-330, doi:10.1038/gim.2014.120 (2015).
- 269 Moura, A. P., Hammerschmidt, T., Deon, M., Giugliani, R. & Vargas, C. R. Investigation of correlation of urinary globotriaosylceramide (Gb3) levels with markers of renal function in patients with Fabry disease. *Clin Chim Acta* **478**, 62-67, doi:10.1016/j.cca.2017.12.033 (2018).
- 270 Vedder, A. C. *et al.* The Dutch Fabry cohort: diversity of clinical manifestations and Gb3 levels. *J Inherit Metab Dis* **30**, 68-78, doi:10.1007/s10545-006-0484-8 (2007).
- 271 Tuttolomondo, A. *et al.* Inter-familial and intra-familial phenotypic variability in three Sicilian families with Anderson-Fabry disease. *Oncotarget* **8**, 61415-61424, doi:10.18632/oncotarget.18250 (2017).
- 272 Hsu, M. J. *et al.* Identification of lysosomal and extralysosomal globotriaosylceramide (Gb3) accumulations before the occurrence of typical pathological changes in the endomyocardial biopsies of Fabry disease patients. *Genet Med* **21**, 224-232, doi:10.1038/s41436-018-0010-z (2019).
- 273 Aerts, J. M. *et al.* Elevated globotriaosylsphingosine is a hallmark of Fabry disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 2812-2817, doi:10.1073/pnas.0712309105 (2008).

- 274 Rombach, S. M. *et al.* Plasma globotriaosylsphingosine: diagnostic value and relation to clinical manifestations of Fabry disease. *Biochim Biophys Acta* **1802**, 741-748, doi:10.1016/j.bbadis.2010.05.003 (2010).
- 275 Azevedo, O. *et al.* Fabry Disease and the Heart: A Comprehensive Review. *Int J Mol Sci* **22**, doi:10.3390/ijms22094434 (2021).
- 276 Shu, L. *et al.* Establishing 3-nitrotyrosine as a biomarker for the vasculopathy of Fabry disease. *Kidney Int* **86**, 58-66, doi:10.1038/ki.2013.520 (2014).
- 277 Biancini, G. B. *et al.* Globotriaosylceramide is correlated with oxidative stress and inflammation in Fabry patients treated with enzyme replacement therapy. *Biochim Biophys Acta* **1822**, 226-232, doi:10.1016/j.bbadis.2011.11.001 (2012).
- 278 Shen, J. S. *et al.* Globotriaosylceramide induces oxidative stress and up-regulates cell adhesion molecule expression in Fabry disease endothelial cells. *Mol Genet Metab* **95**, 163-168, doi:10.1016/j.ymgme.2008.06.016 (2008).
- 279 De Francesco, P. N., Mucci, J. M., Ceci, R., Fossati, C. A. & Rozenfeld, P. A. Fabry disease peripheral blood immune cells release inflammatory cytokines: role of globotriaosylceramide. *Mol Genet Metab* **109**, 93-99, doi:10.1016/j.ymgme.2013.02.003 (2013).
- 280 Mauhin, W. *et al.* Innate and Adaptive Immune Response in Fabry Disease. *JIMD Rep* **22**, 1-10, doi:10.1007/8904\_2014\_371 (2015).
- 281 Beer, G., Reinecke, P., Gabbert, H. E., Hort, W. & Kuhn, H. Fabry disease in patients with hypertrophic cardiomyopathy (HCM). *Z Kardiol* **91**, 992-1002, doi:10.1007/s00392-002-0870-7 (2002).
- 282 Hayashi, Y. *et al.* Elevated Endomyocardial Biopsy Macrophage-Related Markers in Intractable Myocardial Diseases. *Inflammation* **38**, 2288-2299, doi:10.1007/s10753-015-0214-1 (2015).
- 283 Rombach, S. M. *et al.* Vasculopathy in patients with Fabry disease: current controversies and research directions. *Mol Genet Metab* **99**, 99-108, doi:10.1016/j.ymgme.2009.10.004 (2010).
- 284 Del Pinto, R. & Ferri, C. The role of Immunity in Fabry Disease and Hypertension: A Review of a Novel Common Pathway. *High Blood Press Cardiovasc Prev* **27**, 539-546, doi:10.1007/s40292-020-00414-w (2020).
- 285 Rombach, S. M. *et al.* Vascular aspects of Fabry disease in relation to clinical manifestations and elevations in plasma globotriaosylsphingosine. *Hypertension* **60**, 998-1005, doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.195685 (2012).
- 286 Weidemann, F. *et al.* Fibrosis: a key feature of Fabry disease with potential therapeutic implications. *Orphanet J Rare Dis* **8**, 116, doi:10.1186/1750-1172-8-116 (2013).
- 287 Chevrier, M. *et al.* Autophagosome maturation is impaired in Fabry disease. *Autophagy* **6**, 589-599, doi:10.4161/auto.6.5.11943 (2010).
- 288 Tebani, A. *et al.* A Proteomics-Based Analysis Reveals Predictive Biological Patterns in Fabry Disease. *J Clin Med* **9**, doi:10.3390/jcm9051325 (2020).
- 289 Dutsch, M. *et al.* Small fiber dysfunction predominates in Fabry neuropathy. *J Clin Neurophysiol* **19**, 575-586, doi:10.1097/00004691-200212000-00011 (2002).
- 290 Cable, W. J., Kolodny, E. H. & Adams, R. D. Fabry disease: impaired autonomic function. *Neurology* **32**, 498-502, doi:10.1212/wnl.32.5.498 (1982).
- 291 Hopkin, R. J. *et al.* Characterization of Fabry disease in 352 pediatric patients in the Fabry Registry. *Pediatr Res* **64**, 550-555, doi:10.1203/PDR.0b013e318183f132 (2008).
- 292 Hoffmann, B. *et al.* Nature and prevalence of pain in Fabry disease and its response to enzyme replacement therapy--a retrospective analysis from the Fabry Outcome Survey. *Clin J Pain* **23**, 535-542, doi:10.1097/AJP.0b013e318074c986 (2007).
- 293 Charrow, J. A 14-year-old boy with pain in hands and feet. *Pediatr Ann* **38**, 190, 192, doi:10.3928/00904481-20090401-01 (2009).

- 294 Hilz, M. J., Stemper, B. & Kolodny, E. H. Lower limb cold exposure induces pain and prolonged small fiber dysfunction in Fabry patients. *Pain* **84**, 361-365, doi:10.1016/s0304-3959(99)00236-5 (2000).
- 295 Miners, A. H., Holmes, A., Sherr, L., Jenkinson, C. & MacDermot, K. D. Assessment of health-related quality-of-life in males with Anderson Fabry Disease before therapeutic intervention. *Qual Life Res* **11**, 127-133, doi:10.1023/a:1015009210639 (2002).
- 296 Cole, A. L. *et al.* Depression in adults with Fabry disease: a common and under-diagnosed problem. *J Inherit Metab Dis* **30**, 943-951, doi:10.1007/s10545-007-0708-6 (2007).
- 297 Naleschinski, D., Arning, K. & Baron, R. Fabry disease--pain doctors have to find the missing ones. *Pain* **145**, 10-11, doi:10.1016/j.pain.2009.07.025 (2009).
- 298 Cabrera-Salazar, M. A., O'Rourke, E., Charria-Ortiz, G. & Barranger, J. A. Radiological evidence of early cerebral microvascular disease in young children with Fabry disease. *J Pediatr* **147**, 102-105, doi:10.1016/j.jpeds.2005.03.004 (2005).
- 299 Fellgiebel, A., Muller, M. J. & Ginsberg, L. CNS manifestations of Fabry's disease. *Lancet Neurol* **5**, 791-795, doi:10.1016/S1474-4422(06)70548-8 (2006).
- 300 Sims, K., Politei, J., Banikazemi, M. & Lee, P. Stroke in Fabry disease frequently occurs before diagnosis and in the absence of other clinical events: natural history data from the Fabry Registry. *Stroke* **40**, 788-794, doi:10.1161/STROKEAHA.108.526293 (2009).
- 301 Mitsias, P. & Levine, S. R. Cerebrovascular complications of Fabry's disease. *Ann Neurol* **40**, 8-17, doi:10.1002/ana.410400105 (1996).
- 302 Clavelou, P. *et al.* [Neurological aspects of Fabry's disease]. *Rev Neurol (Paris)* **162**, 569-580, doi:10.1016/s0035-3787(06)75051-2 (2006).
- 303 Mendez, M. F., Stanley, T. M., Medel, N. M., Li, Z. & Tedesco, D. T. The vascular dementia of Fabry's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* **8**, 252-257, doi:10.1159/000106640 (1997).
- 304 Okeda, R. & Nisihara, M. An autopsy case of Fabry disease with neuropathological investigation of the pathogenesis of associated dementia. *Neuropathology* **28**, 532-540, doi:10.1111/j.1440-1789.2008.00883.x (2008).
- 305 Fellgiebel, A. *et al.* Diagnostic utility of different MRI and MR angiography measures in Fabry disease. *Neurology* **72**, 63-68, doi:10.1212/01.wnl.0000338566.54190.8a (2009).
- 306 DeGraba, T. *et al.* Profile of endothelial and leukocyte activation in Fabry patients. *Ann Neurol* **47**, 229-233 (2000).
- 307 Moore, D. F. *et al.* Regional cerebral hyperperfusion and nitric oxide pathway dysregulation in Fabry disease: reversal by enzyme replacement therapy. *Circulation* **104**, 1506-1512, doi:10.1161/hc3801.096352 (2001).
- 308 Moore, D. F. *et al.* Elevated cerebral blood flow velocities in Fabry disease with reversal after enzyme replacement. *Stroke* **33**, 525-531, doi:10.1161/hs0202.102601 (2002).
- 309 Ginsberg, L., Manara, R., Valentine, A. R., Kendall, B. & Burlina, A. P. Magnetic resonance imaging changes in Fabry disease. *Acta Paediatr Suppl* **95**, 57-62, doi:10.1080/08035320600618908 (2006).
- 310 Tedeschi, G., Bonavita, S., Banerjee, T. K., Virta, A. & Schiffmann, R. Diffuse central neuronal involvement in Fabry disease: a proton MRS imaging study. *Neurology* **52**, 1663-1667, doi:10.1212/wnl.52.8.1663 (1999).
- 311 Crutchfield, K. E. *et al.* Quantitative analysis of cerebral vasculopathy in patients with Fabry disease. *Neurology* **50**, 1746-1749, doi:10.1212/wnl.50.6.1746 (1998).
- 312 Jardim, L. *et al.* CNS involvement in Fabry disease: clinical and imaging studies before and after 12 months of enzyme replacement therapy. *J Inherit Metab Dis* **27**, 229-240, doi:10.1023/B:BOLI.0000028794.04349.91 (2004).
- 313 Fellgiebel, A. *et al.* White matter lesion severity in male and female patients with Fabry disease. *Neurology* **65**, 600-602, doi:10.1212/01.wnl.0000173030.70057.eb (2005).
- 314 Sheth, K. J., Werlin, S. L., Freeman, M. E. & Hodach, A. E. Gastrointestinal structure and function in Fabry's disease. *Am J Gastroenterol* **76**, 246-251 (1981).

- 315 Hoffmann, B., Schwarz, M., Mehta, A., Keshav, S. & Fabry Outcome Survey European, I. Gastrointestinal symptoms in 342 patients with Fabry disease: prevalence and response to enzyme replacement therapy. *Clin Gastroenterol Hepatol* **5**, 1447-1453, doi:10.1016/j.cgh.2007.08.012 (2007).
- 316 Eng, C. M. *et al.* Fabry disease: guidelines for the evaluation and management of multi-organ system involvement. *Genet Med* **8**, 539-548, doi:10.1097/01.gim.0000237866.70357.c6 (2006).
- 317 Kang, W. H., Chun, S. I. & Lee, S. Generalized anhidrosis associated with Fabry's disease. *J Am Acad Dermatol* **17**, 883-887, doi:10.1016/s0190-9622(87)70274-6 (1987).
- 318 Orteu, C. H. *et al.* Fabry disease and the skin: data from FOS, the Fabry outcome survey. *Br J Dermatol* **157**, 331-337, doi:10.1111/j.1365-2133.2007.08002.x (2007).
- 319 Gupta, S. N. *et al.* Skin-impedance in Fabry Disease: a prospective, controlled, non-randomized clinical study. *BMC Neurol* **8**, 41, doi:10.1186/1471-2377-8-41 (2008).
- 320 Shelley, E. D., Shelley, W. B. & Kurczynski, T. W. Painful fingers, heat intolerance, and telangiectases of the ear: easily ignored childhood signs of Fabry disease. *Pediatr Dermatol* **12**, 215-219, doi:10.1111/j.1525-1470.1995.tb00161.x (1995).
- 321 Germain, D. P. [Fabry's disease (alpha-galactosidase-A deficiency): physiopathology, clinical signs, and genetic aspects]. *J Soc Biol* **196**, 161-173 (2002).
- 322 Lidove, O. *et al.* Hyperhidrosis: a new and often early symptom in Fabry disease. International experience and data from the Fabry Outcome Survey. *Int J Clin Pract* **60**, 1053-1059, doi:10.1111/j.1742-1241.2006.01061.x (2006).
- 323 Mohrenschlager, M., Braun-Falco, M., Ring, J. & Abeck, D. Fabry disease: recognition and management of cutaneous manifestations. *Am J Clin Dermatol* **4**, 189-196, doi:10.2165/00128071-200304030-00005 (2003).
- 324 Wattanasirichaigoon, D. *et al.* Clinical and molecular characterization of an extended family with Fabry disease. *J Med Assoc Thai* **89**, 1528-1535 (2006).
- 325 Orssaud, C., Dufier, J. & Germain, D. Ocular manifestations in Fabry disease: a survey of 32 hemizygous male patients. *Ophthalmic Genet* **24**, 129-139, doi:10.1076/opge.24.3.129.15609 (2003).
- 326 Sher, N. A., Letson, R. D. & Desnick, R. J. The ocular manifestations in Fabry's disease. *Arch Ophthalmol* **97**, 671-676, doi:10.1001/archoph.1979.01020010327008 (1979).
- 327 Germain, D. P., Avan, P., Chassaing, A. & Bonfils, P. Patients affected with Fabry disease have an increased incidence of progressive hearing loss and sudden deafness: an investigation of twenty-two hemizygous male patients. *BMC Med Genet* **3**, 10, doi:10.1186/1471-2350-3-10 (2002).
- 328 Sakurai, Y. *et al.* The hearing status in 12 female and 15 male Japanese Fabry patients. *Auris Nasus Larynx* **36**, 627-632, doi:10.1016/j.anl.2009.01.001 (2009).
- 329 Conti, G. & Sergi, B. Auditory and vestibular findings in Fabry disease: a study of hemizygous males and heterozygous females. *Acta Paediatr Suppl* **92**, 33-37; discussion 27, doi:10.1111/j.1651-2227.2003.tb00219.x (2003).
- 330 Keilmann, A., Hajioff, D., Ramaswami, U. & Investigators, F. O. S. Ear symptoms in children with Fabry disease: data from the Fabry Outcome Survey. *J Inherit Metab Dis* **32**, 739, doi:10.1007/s10545-009-1290-x (2009).
- 331 Ries, M. *et al.* Neuropathic and cerebrovascular correlates of hearing loss in Fabry disease. *Brain* **130**, 143-150, doi:10.1093/brain/awl310 (2007).
- 332 Kampmann, C. *et al.* Cardiac manifestations of Anderson-Fabry disease in children and adolescents. *Acta Paediatr* **97**, 463-469, doi:10.1111/j.1651-2227.2008.00700.x (2008).
- 333 Schiffmann, R. *et al.* Fabry disease: progression of nephropathy, and prevalence of cardiac and cerebrovascular events before enzyme replacement therapy. *Nephrol Dial Transplant* **24**, 2102-2111, doi:10.1093/ndt/gfp031 (2009).
- 334 Linhart, A. *et al.* New insights in cardiac structural changes in patients with Fabry's disease. *Am Heart J* **139**, 1101-1108, doi:10.1067/mhj.2000.105105 (2000).

- 335 Kampmann, C. *et al.* Cardiac manifestations of Anderson-Fabry disease in heterozygous females. *J Am Coll Cardiol* **40**, 1668-1674, doi:10.1016/s0735-1097(02)02380-x (2002).
- 336 Senechal, M. & Germain, D. P. Fabry disease: a functional and anatomical study of cardiac manifestations in 20 hemizygous male patients. *Clin Genet* **63**, 46-52, doi:10.1034/j.1399-0004.2003.630107.x (2003).
- 337 Shah, J. S. *et al.* Prevalence and clinical significance of cardiac arrhythmia in Anderson-Fabry disease. *Am J Cardiol* **96**, 842-846, doi:10.1016/j.amjcard.2005.05.033 (2005).
- 338 Elliott, P. M. *et al.* Coronary microvascular dysfunction in male patients with Anderson-Fabry disease and the effect of treatment with alpha galactosidase A. *Heart* **92**, 357-360, doi:10.1136/hrt.2004.054015 (2006).
- 339 Moon, J. C. *et al.* The histological basis of late gadolinium enhancement cardiovascular magnetic resonance in a patient with Anderson-Fabry disease. *J Cardiovasc Magn Reson* **8**, 479-482, doi:10.1080/10976640600605002 (2006).
- 340 Hasegawa, H. *et al.* Images in cardiovascular medicine. Transition from left ventricular hypertrophy to massive fibrosis in the cardiac variant of Fabry disease. *Circulation* **113**, e720-721, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.584292 (2006).
- 341 Weidemann, F. *et al.* The variation of morphological and functional cardiac manifestation in Fabry disease: potential implications for the time course of the disease. *Eur Heart J* **26**, 1221-1227, doi:10.1093/eurheartj/ehi143 (2005).
- 342 Linhart, A. *et al.* Cardiac manifestations of Anderson-Fabry disease: results from the international Fabry outcome survey. *Eur Heart J* **28**, 1228-1235, doi:10.1093/eurheartj/ehm153 (2007).
- 343 Takenaka, T. *et al.* Terminal stage cardiac findings in patients with cardiac Fabry disease: an electrocardiographic, echocardiographic, and autopsy study. *J Cardiol* **51**, 50-59, doi:10.1016/j.jjcc.2007.12.001 (2008).
- 344 Mehta, A. *et al.* Natural course of Fabry disease: changing pattern of causes of death in FOS - Fabry Outcome Survey. *J Med Genet* **46**, 548-552, doi:10.1136/jmg.2008.065904 (2009).
- 345 Ponsiglione, A. *et al.* Cardiovascular magnetic resonance native T1 mapping in Anderson-Fabry disease: a systematic review and meta-analysis. *J Cardiovasc Magn Reson* **24**, 31, doi:10.1186/s12968-022-00859-z (2022).
- 346 Tao, E., Moiseev, A., Mershina, E., Bobkova, I. & Moiseev, S. Predictive Value of Cardiac MRI in Patients with Fabry Disease. *Radiology* **296**, E123, doi:10.1148/radiol.2020200909 (2020).
- 347 Schelbert, E. B. & Messroghli, D. R. State of the Art: Clinical Applications of Cardiac T1 Mapping. *Radiology* **278**, 658-676, doi:10.1148/radiol.2016141802 (2016).
- 348 Roller, F. C. *et al.* Assessment of Cardiac Involvement in Fabry Disease (FD) with Native T1 Mapping. *Rofo* **191**, 932-939, doi:10.1055/a-0836-2723 (2019).
- 349 Gubler, M. C. *et al.* Early renal changes in hemizygous and heterozygous patients with Fabry's disease. *Kidney Int* **13**, 223-235, doi:10.1038/ki.1978.32 (1978).
- 350 Sessa, A. *et al.* Renal pathological changes in Fabry disease. *J Inherit Metab Dis* **24 Suppl 2**, 66-70; discussion 65, doi:10.1023/a:1012423924648 (2001).
- 351 Tondel, C., Bostad, L., Hirth, A. & Svarstad, E. Renal biopsy findings in children and adolescents with Fabry disease and minimal albuminuria. *Am J Kidney Dis* **51**, 767-776, doi:10.1053/j.ajkd.2007.12.032 (2008).
- 352 Ramaswami, U., Najafian, B., Schieppati, A., Mauer, M. & Bichet, D. G. Assessment of renal pathology and dysfunction in children with Fabry disease. *Clin J Am Soc Nephrol* **5**, 365-370, doi:10.2215/CJN.08091109 (2010).
- 353 Grunfeld, J. P., Lidove, O., Joly, D. & Barbey, F. Renal disease in Fabry patients. *J Inherit Metab Dis* **24 Suppl 2**, 71-74; discussion 65, doi:10.1023/a:1012475908718 (2001).
- 354 Fogo, A. B. *et al.* Scoring system for renal pathology in Fabry disease: report of the International Study Group of Fabry Nephropathy (ISGFN). *Nephrol Dial Transplant* **25**, 2168-2177, doi:10.1093/ndt/gfp528 (2010).

- 355 Fervenza, F. C., Torra, R. & Lager, D. J. Fabry disease: an underrecognized cause of proteinuria. *Kidney Int* **73**, 1193-1199, doi:10.1038/sj.ki.5002677 (2008).
- 356 Ortiz, A. *et al.* Nephropathy in males and females with Fabry disease: cross-sectional description of patients before treatment with enzyme replacement therapy. *Nephrol Dial Transplant* **23**, 1600-1607, doi:10.1093/ndt/gfm848 (2008).
- 357 Branton, M. H. *et al.* Natural history of Fabry renal disease: influence of alpha-galactosidase A activity and genetic mutations on clinical course. *Medicine (Baltimore)* **81**, 122-138, doi:10.1097/00005792-200203000-00003 (2002).
- 358 Ries, M. *et al.* Quantitative dysmorphology assessment in Fabry disease. *Genet Med* **8**, 96-101, doi:10.1097/01.gim.0000200950.25118.dd (2006).
- 359 Cox-Brinkman, J. *et al.* Three-dimensional face shape in Fabry disease. *Eur J Hum Genet* **15**, 535-542, doi:10.1038/sj.ejhg.5201798 (2007).
- 360 Papaxanthos-Roche, A. *et al.* Semen and male genital tract characteristics of patients with Fabry disease: the FERTIFABRY multicentre observational study. *Basic Clin Androl* **29**, 7, doi:10.1186/s12610-019-0088-4 (2019).
- 361 Rosenberg, D. M. *et al.* Chronic airflow obstruction in Fabry's disease. *Am J Med* **68**, 898-905, doi:10.1016/0002-9343(80)90224-7 (1980).
- 362 Magage, S. *et al.* Natural history of the respiratory involvement in Anderson-Fabry disease. *J Inherit Metab Dis* **30**, 790-799, doi:10.1007/s10545-007-0616-9 (2007).
- 363 Germain, D. P., Benistan, K., Boutouyrie, P. & Mutschler, C. Osteopenia and osteoporosis: previously unrecognized manifestations of Fabry disease. *Clin Genet* **68**, 93-95, doi:10.1111/j.1399-0004.2005.00457.x (2005).
- 364 Kleinert, J. *et al.* Anemia is a new complication in Fabry disease: data from the Fabry Outcome Survey. *Kidney Int* **67**, 1955-1960, doi:10.1111/j.1523-1755.2005.00294.x (2005).
- 365 Boutouyrie, P. *et al.* Arterial remodelling in Fabry disease. *Acta Paediatr Suppl* **91**, 62-66, doi:10.1111/j.1651-2227.2002.tb03113.x (2002).
- 366 Barbey, F. *et al.* Cardiac and vascular hypertrophy in Fabry disease: evidence for a new mechanism independent of blood pressure and glycosphingolipid deposition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**, 839-844, doi:10.1161/01.ATV.0000209649.60409.38 (2006).
- 367 Ries, M. *et al.* Pediatric Fabry disease. *Pediatrics* **115**, e344-355, doi:10.1542/peds.2004-1678 (2005).
- 368 Zarate, Y. A. & Hopkin, R. J. Fabry's disease. *Lancet* **372**, 1427-1435, doi:10.1016/S0140-6736(08)61589-5 (2008).
- 369 Nakao, S. *et al.* An atypical variant of Fabry's disease in men with left ventricular hypertrophy. *N Engl J Med* **333**, 288-293, doi:10.1056/NEJM199508033330504 (1995).
- 370 Nakao, S. *et al.* Fabry disease: detection of undiagnosed hemodialysis patients and identification of a "renal variant" phenotype. *Kidney Int* **64**, 801-807, doi:10.1046/j.1523-1755.2003.00160.x (2003).
- 371 Hagege, A. A. *et al.* Screening patients with hypertrophic cardiomyopathy for Fabry disease using a filter-paper test: the FOCUS study. *Heart* **97**, 131-136, doi:10.1136/hrt.2010.200188 (2011).
- 372 Brouns, R. *et al.* Belgian Fabry study: prevalence of Fabry disease in a cohort of 1000 young patients with cerebrovascular disease. *Stroke* **41**, 863-868, doi:10.1161/STROKEAHA.110.579409 (2010).
- 373 Elleder, M. *et al.* Cardiocyte storage and hypertrophy as a sole manifestation of Fabry's disease. Report on a case simulating hypertrophic non-obstructive cardiomyopathy. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* **417**, 449-455, doi:10.1007/BF01606034 (1990).
- 374 Ishii, S., Kase, R., Sakuraba, H. & Suzuki, Y. Characterization of a mutant alpha-galactosidase gene product for the late-onset cardiac form of Fabry disease. *Biochem Biophys Res Commun* **197**, 1585-1589, doi:10.1006/bbrc.1993.2659 (1993).

- 375 Veinot, J. P. Prevalence of Anderson-Fabry disease in male patients with late onset hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* **106**, e73; author reply e73, doi:10.1161/01.cir.0000033853.29869.08 (2002).
- 376 Kotanko, P. *et al.* Results of a nationwide screening for Anderson-Fabry disease among dialysis patients. *J Am Soc Nephrol* **15**, 1323-1329, doi:10.1097/01.asn.0000124671.61963.1e (2004).
- 377 Kleinert, J. *et al.* Anderson-Fabry disease: a case-finding study among male kidney transplant recipients in Austria. *Transpl Int* **22**, 287-292, doi:10.1111/j.1432-2277.2008.00791.x (2009).
- 378 von Scheidt, W. *et al.* An atypical variant of Fabry's disease with manifestations confined to the myocardium. *N Engl J Med* **324**, 395-399, doi:10.1056/NEJM199102073240607 (1991).
- 379 Yoshitama, T. *et al.* Molecular genetic, biochemical, and clinical studies in three families with cardiac Fabry's disease. *Am J Cardiol* **87**, 71-75, doi:10.1016/s0002-9149(00)01275-3 (2001).
- 380 Schaefer, E., Mehta, A. & Gal, A. Genotype and phenotype in Fabry disease: analysis of the Fabry Outcome Survey. *Acta Paediatr Suppl* **94**, 87-92; discussion 79, doi:10.1111/j.1651-2227.2005.tb02119.x (2005).
- 381 Pan, X. *et al.* Genotype: A Crucial but Not Unique Factor Affecting the Clinical Phenotypes in Fabry Disease. *PLoS One* **11**, e0161330, doi:10.1371/journal.pone.0161330 (2016).
- 382 Mignani, R. *et al.* Different renal phenotypes in related adult males with Fabry disease with the same classic genotype. *Mol Genet Genomic Med* **5**, 438-442, doi:10.1002/mgg3.292 (2017).
- 383 Pinto, L. L., Vieira, T. A., Giugliani, R. & Schwartz, I. V. Expression of the disease on female carriers of X-linked lysosomal disorders: a brief review. *Orphanet J Rare Dis* **5**, 14, doi:10.1186/1750-1172-5-14 (2010).
- 384 Deegan, P. B., Bahner, F., Barba, M., Hughes, D. A. & Beck, M. in *Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS* (eds A. Mehta, M. Beck, & G. Sunder-Plassmann) (2006).
- 385 Whybra, C. *et al.* Anderson-Fabry disease: clinical manifestations of disease in female heterozygotes. *J Inherit Metab Dis* **24**, 715-724, doi:10.1023/a:1012993305223 (2001).
- 386 Doi, Y., Toda, G. & Yano, K. Sisters with atypical Fabry's disease with complete atrioventricular block. *Heart* **89**, e2, doi:10.1136/heart.89.1.e2 (2003).
- 387 Baehner, F. *et al.* Enzyme replacement therapy in heterozygous females with Fabry disease: results of a phase IIIB study. *J Inherit Metab Dis* **26**, 617-627, doi:10.1023/b:boli.0000005658.14563.77 (2003).
- 388 Ro, L. S. *et al.* Current perception threshold testing in Fabry's disease. *Muscle Nerve* **22**, 1531-1537, doi:10.1002/(sici)1097-4598(199911)22:11<1531::aid-mus7>3.0.co;2-o (1999).
- 389 Germain, D. P., Benistan, K. & Angelova, L. X-linked inheritance and its implication in the diagnosis and management of female patients in Fabry disease. *Rev Med Interne* **31 Suppl 2**, S209-213, doi:10.1016/S0248-8663(10)70013-8 (2010).
- 390 MacDermot, K. D., Holmes, A. & Miners, A. H. Anderson-Fabry disease: clinical manifestations and impact of disease in a cohort of 60 obligate carrier females. *J Med Genet* **38**, 769-775, doi:10.1136/jmg.38.11.769 (2001).
- 391 Chowdhury, M. M. & Holt, P. J. Pain in Anderson-Fabry's disease. *Lancet* **357**, 887, doi:10.1016/S0140-6736(05)71823-7 (2001).
- 392 Ramaswami, U., Parini, R. & Pintos-Morell, G. in *Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS* (eds A. Mehta, M. Beck, & G. Sunder-Plassmann) (2006).
- 393 Pintos-Morell, G. & Beck, M. Fabry disease in children and the effects of enzyme replacement treatment. *Eur J Pediatr* **168**, 1355-1363, doi:10.1007/s00431-009-0937-9 (2009).
- 394 Yuen, N. W., Lam, C. W., Chow, T. C. & Chiu, M. C. A characteristic dissection microscopy appearance of a renal biopsy of a Fabry heterozygote. *Nephron* **77**, 354-356, doi:10.1159/000190301 (1997).
- 395 Migeon, B. R. X inactivation, female mosaicism, and sex differences in renal diseases. *J Am Soc Nephrol* **19**, 2052-2059, doi:10.1681/ASN.2008020198 (2008).

- 396 Murata, R. *et al.* Fifteen-year follow-up of a heterozygous Fabry's disease patient associated with pre-excitation syndrome. *Intern Med* **38**, 476-481, doi:10.2169/internalmedicine.38.476 (1999).
- 397 Koitabashi, N. *et al.* Biopsy-proven cardiomyopathy in heterozygous Fabry's disease. *Jpn Circ J* **63**, 572-575, doi:10.1253/jcj.63.572 (1999).
- 398 Niemann, M. *et al.* Differences in Fabry cardiomyopathy between female and male patients: consequences for diagnostic assessment. *JACC Cardiovasc Imaging* **4**, 592-601, doi:10.1016/j.jcmg.2011.01.020 (2011).
- 399 Michaud, M. *et al.* [Fabry disease: A review]. *Rev Med Interne* **42**, 110-119, doi:10.1016/j.revmed.2020.08.019 (2021).
- 400 Benjamin, E. R. *et al.* The validation of pharmacogenetics for the identification of Fabry patients to be treated with migalastat. *Genet Med* **19**, 430-438, doi:10.1038/gim.2016.122 (2017).
- 401 Ferri, L. *et al.* Pitfalls in the detection of gross gene rearrangements using MLPA in Fabry disease. *Clin Chim Acta* **452**, 82-86, doi:10.1016/j.cca.2015.10.027 (2016).
- 402 Young, E. *et al.* Is globotriaosylceramide a useful biomarker in Fabry disease? *Acta Paediatr Suppl* **94**, 51-54; discussion 37-58, doi:10.1111/j.1651-2227.2005.tb02112.x (2005).
- 403 Togawa, T. *et al.* Plasma globotriaosylsphingosine as a biomarker of Fabry disease. *Mol Genet Metab* **100**, 257-261, doi:10.1016/j.ymgme.2010.03.020 (2010).
- 404 Duro, G. *et al.* Mutations in the GLA Gene and LysoGb3: Is It Really Anderson-Fabry Disease? *Int J Mol Sci* **19**, doi:10.3390/ijms19123726 (2018).
- 405 Baydakova, G. V. *et al.* alpha-Galactosidase A/lysoGb3 ratio as a potential marker for Fabry disease in females. *Clin Chim Acta* **501**, 27-32, doi:10.1016/j.cca.2019.10.031 (2020).
- 406 Alharbi, F. J. *et al.* Globotriaosylsphingosine (Lyso-Gb(3)) as a biomarker for cardiac variant (N215S) Fabry disease. *J Inherit Metab Dis* **41**, 239-247, doi:10.1007/s10545-017-0127-2 (2018).
- 407 Lenders, M. *et al.* Mutation-specific Fabry disease patient-derived cell model to evaluate the amenability to chaperone therapy. *J Med Genet* **56**, 548-556, doi:10.1136/jmedgenet-2019-106005 (2019).
- 408 Nowak, A. *et al.* Fabry disease genotype, phenotype, and migalastat amenability: Insights from a national cohort. *J Inherit Metab Dis* **43**, 326-333, doi:10.1002/jimd.12167 (2020).
- 409 Muntze, J. *et al.* Oral Chaperone Therapy Migalastat for Treating Fabry Disease: Enzymatic Response and Serum Biomarker Changes After 1 Year. *Clin Pharmacol Ther* **105**, 1224-1233, doi:10.1002/cpt.1321 (2019).
- 410 Ferreira, S. *et al.* Variations in the GLA gene correlate with globotriaosylceramide and globotriaosylsphingosine analog levels in urine and plasma. *Clin Chim Acta* **447**, 96-104, doi:10.1016/j.cca.2015.06.003 (2015).
- 411 Heywood, W. E. *et al.* Global glycosphingolipid analysis in urine and plasma of female Fabry disease patients. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* **1865**, 2726-2735, doi:10.1016/j.bbadis.2019.07.005 (2019).
- 412 Boutin, M. *et al.* Separation and Analysis of Lactosylceramide, Galabiosylceramide, and Globotriaosylceramide by LC-MS/MS in Urine of Fabry Disease Patients. *Anal Chem* **89**, 13382-13390, doi:10.1021/acs.analchem.7b03609 (2017).
- 413 Riccio, E., Sabbatini, M., Capuano, I. & Pisani, A. Early Biomarkers of Fabry Nephropathy: A Review of the Literature. *Nephron* **143**, 274-281, doi:10.1159/000502907 (2019).
- 414 Pieroni, M. *et al.* Cardiac Involvement in Fabry Disease: JACC Review Topic of the Week. *J Am Coll Cardiol* **77**, 922-936, doi:10.1016/j.jacc.2020.12.024 (2021).
- 415 Simonetta, I., Tuttolomondo, A., Daidone, M. & Pinto, A. Biomarkers in Anderson-Fabry Disease. *Int J Mol Sci* **21**, doi:10.3390/ijms21218080 (2020).
- 416 Carnicer-Caceres, C. *et al.* Biomarkers in Fabry Disease. Implications for Clinical Diagnosis and Follow-up. *J Clin Med* **10**, doi:10.3390/jcm10081664 (2021).

- 417 van der Tol, L. *et al.* A systematic review on screening for Fabry disease: prevalence of  
individuals with genetic variants of unknown significance. *J Med Genet* **51**, 1-9,  
doi:10.1136/jmedgenet-2013-101857 (2014).
- 418 Favalli, V. *et al.* Genetic Screening of Anderson-Fabry Disease in Proband Referred From  
Multispecialty Clinics. *J Am Coll Cardiol* **68**, 1037-1050, doi:10.1016/j.jacc.2016.05.090  
(2016).
- 419 Tai, C. L. *et al.* The use of high resolution melting analysis to detect Fabry mutations in  
heterozygous females via dry bloodspots. *Clin Chim Acta* **413**, 422-427,  
doi:10.1016/j.cca.2011.10.023 (2012).
- 420 Lee, S. H. *et al.* High-throughput detection of common sequence variations of Fabry disease  
in Taiwan using DNA mass spectrometry. *Mol Genet Metab* **111**, 507-512,  
doi:10.1016/j.ymgme.2014.02.004 (2014).
- 421 Lu, Y. H. *et al.* Improvement in the sensitivity of newborn screening for Fabry disease among  
females through the use of a high-throughput and cost-effective method, DNA mass  
spectrometry. *J Hum Genet* **63**, 1-8, doi:10.1038/s10038-017-0366-y (2018).
- 422 Wang, R. Y., Bodamer, O. A., Watson, M. S., Wilcox, W. R. & Diseases, A. W. G. o. D. C. o. L. S.  
Lysosomal storage diseases: diagnostic confirmation and management of presymptomatic  
individuals. *Genet Med* **13**, 457-484, doi:10.1097/GIM.0b013e318211a7e1 (2011).
- 423 Germain, D. P. *et al.* The benefits and challenges of family genetic testing in rare genetic  
diseases-lessons from Fabry disease. *Mol Genet Genomic Med* **9**, e1666,  
doi:10.1002/mgg3.1666 (2021).
- 424 Gragnaniello, V. *et al.* Newborn Screening for Fabry Disease in Northeastern Italy: Results of  
Five Years of Experience. *Biomolecules* **11**, doi:10.3390/biom11070951 (2021).
- 425 Burton, B. K. *et al.* Newborn Screening for Lysosomal Storage Disorders in Illinois: The Initial  
15-Month Experience. *J Pediatr* **190**, 130-135, doi:10.1016/j.jpeds.2017.06.048 (2017).
- 426 Laney, D. A. & Fernhoff, P. M. Diagnosis of Fabry disease via analysis of family history. *J Genet  
Couns* **17**, 79-83, doi:10.1007/s10897-007-9128-x (2008).
- 427 Kokotos, F. The vulnerable child syndrome. *Pediatr Rev* **30**, 193-194, doi:10.1542/pir.30-5-  
193 (2009).
- 428 Timmermans, S. & Buchbinder, M. Patients-in-waiting: Living between sickness and health in  
the genomics era. *J Health Soc Behav* **51**, 408-423, doi:10.1177/0022146510386794 (2010).
- 429 Sawada, T. *et al.* Newborn screening for Fabry disease in the western region of Japan. *Mol  
Genet Metab Rep* **22**, 100562, doi:10.1016/j.ymgmr.2019.100562 (2020).
- 430 Linthorst, G. E., Vedder, A. C., Aerts, J. M. & Hollak, C. E. Screening for Fabry disease using  
whole blood spots fails to identify one-third of female carriers. *Clin Chim Acta* **353**, 201-203,  
doi:10.1016/j.cccn.2004.10.019 (2005).
- 431 Linthorst, G. E., Poorthuis, B. J. & Hollak, C. E. Enzyme activity for determination of presence  
of Fabry disease in women results in 40% false-negative results. *J Am Coll Cardiol* **51**, 2082;  
author reply 2082-2083, doi:10.1016/j.jacc.2008.02.050 (2008).
- 432 Hsu, T. R. & Niu, D. M. Fabry disease: Review and experience during newborn screening.  
*Trends Cardiovasc Med* **28**, 274-281, doi:10.1016/j.tcm.2017.10.001 (2018).
- 433 Bouwman, M. G. *et al.* Fabry patients' experiences with the timing of diagnosis relevant for  
the discussion on newborn screening. *Mol Genet Metab* **109**, 201-207,  
doi:10.1016/j.ymgme.2013.03.008 (2013).
- 434 Lisi, E. C. & Ali, N. Opinions of adults affected with later-onset lysosomal storage diseases  
regarding newborn screening: A qualitative study. *J Genet Couns* **30**, 1544-1558,  
doi:10.1002/jgc4.1421 (2021).
- 435 Lisi, E. C., Gillespie, S., Laney, D. & Ali, N. Patients' perspectives on newborn screening for  
later-onset lysosomal storage diseases. *Mol Genet Metab* **119**, 109-114,  
doi:10.1016/j.ymgme.2016.07.009 (2016).

- 436 Bennett, R. L. *et al.* Fabry disease in genetic counseling practice: recommendations of the National Society of Genetic Counselors. *J Genet Couns* **11**, 121-146, doi:10.1023/a:1014545521753 (2002).
- 437 Wanner, C. *et al.* European expert consensus statement on therapeutic goals in Fabry disease. *Mol Genet Metab* **124**, 189-203, doi:10.1016/j.ymgme.2018.06.004 (2018).
- 438 Hopkin, R. J. *et al.* The management and treatment of children with Fabry disease: A United States-based perspective. *Mol Genet Metab* **117**, 104-113, doi:10.1016/j.ymgme.2015.10.007 (2016).
- 439 Biegstraaten, M. *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* **10**, 36, doi:10.1186/s13023-015-0253-6 (2015).
- 440 Lenders, M. & Brand, E. Fabry Disease: The Current Treatment Landscape. *Drugs* **81**, 635-645, doi:10.1007/s40265-021-01486-1 (2021).
- 441 Umer, M. & Kalra, D. K. Treatment of Fabry Disease: Established and Emerging Therapies. *Pharmaceuticals (Basel)* **16**, doi:10.3390/ph16020320 (2023).
- 442 Brady, R. O. *et al.* Replacement therapy for inherited enzyme deficiency. Use of purified ceramidetrihexosidase in Fabry's disease. *N Engl J Med* **289**, 9-14, doi:10.1056/NEJM197307052890103 (1973).
- 443 Eng, C. M. *et al.* Safety and efficacy of recombinant human alpha-galactosidase A replacement therapy in Fabry's disease. *N Engl J Med* **345**, 9-16, doi:10.1056/NEJM200107053450102 (2001).
- 444 Weidemann, F. *et al.* Improvement of cardiac function during enzyme replacement therapy in patients with Fabry disease: a prospective strain rate imaging study. *Circulation* **108**, 1299-1301, doi:10.1161/01.CIR.0000091253.71282.04 (2003).
- 445 Schiffmann, R. *et al.* Agalsidase alfa in pediatric patients with Fabry disease: a 6.5-year open-label follow-up study. *Orphanet J Rare Dis* **9**, 169, doi:10.1186/s13023-014-0169-6 (2014).
- 446 Banikazemi, M. *et al.* Agalsidase-beta therapy for advanced Fabry disease: a randomized trial. *Ann Intern Med* **146**, 77-86, doi:10.7326/0003-4819-146-2-200701160-00148 (2007).
- 447 Arends, M. *et al.* Agalsidase alfa versus agalsidase beta for the treatment of Fabry disease: an international cohort study. *J Med Genet* **55**, 351-358, doi:10.1136/jmedgenet-2017-104863 (2018).
- 448 Sakuraba, H. *et al.* Comparison of the effects of agalsidase alfa and agalsidase beta on cultured human Fabry fibroblasts and Fabry mice. *J Hum Genet* **51**, 180-188, doi:10.1007/s10038-005-0342-9 (2006).
- 449 Tsuboi, K. & Yamamoto, H. Clinical course of patients with Fabry disease who were switched from agalsidase-beta to agalsidase-alpha. *Genet Med* **16**, 766-772, doi:10.1038/gim.2014.28 (2014).
- 450 Mauhin, W. *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* **13**, 127, doi:10.1186/s13023-018-0877-4 (2018).
- 451 Lenders, M. *et al.* Serum-Mediated Inhibition of Enzyme Replacement Therapy in Fabry Disease. *J Am Soc Nephrol* **27**, 256-264, doi:10.1681/ASN.2014121226 (2016).
- 452 Harris, J. M. & Chess, R. B. Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nat Rev Drug Discov* **2**, 214-221, doi:10.1038/nrd1033 (2003).
- 453 Hughes, D. A. *et al.* Oral pharmacological chaperone migalastat compared with enzyme replacement therapy in Fabry disease: 18-month results from the randomised phase III ATTRACT study. *J Med Genet* **54**, 288-296, doi:10.1136/jmedgenet-2016-104178 (2017).
- 454 Feldt-Rasmussen, U. *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. *Mol Genet Metab* **131**, 219-228, doi:10.1016/j.ymgme.2020.07.007 (2020).

- 455 Yasuda, M. *et al.* AAV2/6 Gene Therapy in a Murine Model of Fabry Disease Results in Supraphysiological Enzyme Activity and Effective Substrate Reduction. *Mol Ther Methods Clin Dev* **18**, 607-619, doi:10.1016/j.omtm.2020.07.002 (2020).
- 456 Ziegler, R. J. *et al.* Correction of the Biochemical and Functional Deficits in Fabry Mice Following AAV8-mediated Hepatic Expression of alpha-galactosidase A. *Mol Ther* **15**, 492-500, doi:10.1038/sj.mt.6300066 (2007).
- 457 Kattenhorn, L. M. *et al.* Adeno-Associated Virus Gene Therapy for Liver Disease. *Hum Gene Ther* **27**, 947-961, doi:10.1089/hum.2016.160 (2016).
- 458 Jeyakumar, J. M. *et al.* Preclinical evaluation of FLT190, a liver-directed AAV gene therapy for Fabry disease. *Gene Ther* **30**, 487-502, doi:10.1038/s41434-022-00381-y (2023).
- 459 Khan, A. *et al.* Lentivirus-mediated gene therapy for Fabry disease. *Nat Commun* **12**, 1178, doi:10.1038/s41467-021-21371-5 (2021).
- 460 Chang, S. K. *et al.* in *The 12th Asia-Pacific Conference on Human Genetics*.
- 461 Nuijten, M. Pricing Zolgensma - the world's most expensive drug. *J Mark Access Health Policy* **10**, 2022353, doi:10.1080/20016689.2021.2022353 (2022).
- 462 Green, A. G. Spinal muscular atrophy and the world's most expensive medicines: The price of life. *Dev Med Child Neurol* **64**, 676-677, doi:10.1111/dmcn.15204 (2022).
- 463 Zedde, M. *et al.* Anderson-Fabry Disease: A New Piece of the Lysosomal Puzzle in Parkinson Disease? *Biomedicines* **10**, doi:10.3390/biomedicines10123132 (2022).
- 464 Khanna, R. *et al.* The pharmacological chaperone 1-deoxygalactonojirimycin reduces tissue globotriaosylceramide levels in a mouse model of Fabry disease. *Mol Ther* **18**, 23-33, doi:10.1038/mt.2009.220 (2010).
- 465 Wu, Y. S. *et al.* Migalastat Tissue Distribution: Extrapolation From Mice to Humans Using Pharmacokinetic Modeling and Comparison With Agalsidase Beta Tissue Distribution in Mice. *Clin Pharmacol Drug Dev* **10**, 1075-1088, doi:10.1002/cpdd.941 (2021).
- 466 Kahn, P. Anderson-Fabry disease: a histopathological study of three cases with observations on the mechanism of production of pain. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **36**, 1053-1062, doi:10.1136/jnnp.36.6.1053 (1973).
- 467 Lohle, M. *et al.* Clinical prodromes of neurodegeneration in Anderson-Fabry disease. *Neurology* **84**, 1454-1464, doi:10.1212/WNL.0000000000001450 (2015).
- 468 Coccozza, S. *et al.* Alterations of functional connectivity of the motor cortex in Fabry disease: An RS-fMRI study. *Neurology* **88**, 1822-1829, doi:10.1212/WNL.0000000000003913 (2017).
- 469 Coccozza, S., Russo, C., Pontillo, G., Pisani, A. & Brunetti, A. Neuroimaging in Fabry disease: current knowledge and future directions. *Insights Imaging* **9**, 1077-1088, doi:10.1007/s13244-018-0664-8 (2018).
- 470 Sidransky, E. & Lopez, G. The link between the GBA gene and parkinsonism. *Lancet Neurol* **11**, 986-998, doi:10.1016/S1474-4422(12)70190-4 (2012).
- 471 Dagan, E. *et al.* The contribution of Niemann-Pick SMPD1 mutations to Parkinson disease in Ashkenazi Jews. *Parkinsonism Relat Disord* **21**, 1067-1071, doi:10.1016/j.parkreldis.2015.06.016 (2015).
- 472 Orimo, S., Iwasaki, T., Yoshino, H., Arai, M. & Hiyamuta, E. [An autopsied case of Fabry's disease presenting with parkinsonism and cardiomegaly as a cardinal clinical manifestation]. *Rinsho Shinkeigaku* **34**, 1003-1007 (1994).
- 473 Buechner, S., De Cristofaro, M. T., Ramat, S. & Borsini, W. Parkinsonism and Anderson Fabry's disease: a case report. *Mov Disord* **21**, 103-107, doi:10.1002/mds.20675 (2006).
- 474 Perillo, S. *et al.* Screening for Fabry disease in a series of Parkinson's disease patients and literature review. *Neurol Sci* **44**, 1235-1241, doi:10.1007/s10072-022-06554-2 (2023).
- 475 Wanner, C. *et al.* Global reach of over 20 years of experience in the patient-centered Fabry Registry: Advancement of Fabry disease expertise and dissemination of real-world evidence to the Fabry community. *Mol Genet Metab* **139**, 107603, doi:10.1016/j.ymgme.2023.107603 (2023).

- 476 Beck, M. *et al.* Twenty years of the Fabry Outcome Survey (FOS): insights, achievements, and lessons learned from a global patient registry. *Orphanet J Rare Dis* **17**, 238, doi:10.1186/s13023-022-02392-9 (2022).
- 477 Yadav, S. P. The wholeness in suffix -omics, -omes, and the word om. *J Biomol Tech* **18**, 277 (2007).
- 478 International Human Genome Sequencing, C. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* **431**, 931-945, doi:10.1038/nature03001 (2004).
- 479 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* **17**, doi:10.3390/ijms17091555 (2016).
- 480 Iyer, V. R. *et al.* The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum. *Science* **283**, 83-87, doi:10.1126/science.283.5398.83 (1999).
- 481 Bhalla, U. S. & Iyengar, R. Emergent properties of networks of biological signaling pathways. *Science* **283**, 381-387, doi:10.1126/science.283.5400.381 (1999).
- 482 Alon, U., Surette, M. G., Barkai, N. & Leibler, S. Robustness in bacterial chemotaxis. *Nature* **397**, 168-171, doi:10.1038/16483 (1999).
- 483 Stephanou, A., Fanchon, E., Innominato, P. F. & Ballesta, A. Systems Biology, Systems Medicine, Systems Pharmacology: The What and The Why. *Acta Biotheor* **66**, 345-365, doi:10.1007/s10441-018-9330-2 (2018).
- 484 Wang, H. *et al.* Deep learning in systems medicine. *Brief Bioinform* **22**, 1543-1559, doi:10.1093/bib/bbaa237 (2021).
- 485 Razzak, M. I., Imran, M. & Xu, G. Big data analytics for preventive medicine. *Neural Comput Appl* **32**, 4417-4451, doi:10.1007/s00521-019-04095-y (2020).
- 486 Cava, C., Pisati, M., Frasca, M. & Castiglioni, I. Identification of Breast Cancer Subtype-Specific Biomarkers by Integrating Copy Number Alterations and Gene Expression Profiles. *Medicina (Kaunas)* **57**, doi:10.3390/medicina57030261 (2021).
- 487 Chaudhary, K., Poirion, O. B., Lu, L. & Garmire, L. X. Deep Learning-Based Multi-Omics Integration Robustly Predicts Survival in Liver Cancer. *Clin Cancer Res* **24**, 1248-1259, doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-0853 (2018).
- 488 Shen, D., Wu, G. & Suk, H. I. Deep Learning in Medical Image Analysis. *Annu Rev Biomed Eng* **19**, 221-248, doi:10.1146/annurev-bioeng-071516-044442 (2017).
- 489 Gonzalez, G., Washko, G. R. & Estepar, R. S. J. Deep learning for biomarker regression: application to osteoporosis and emphysema on chest CT scans. *Proc SPIE Int Soc Opt Eng* **10574**, doi:10.1117/12.2293455 (2018).
- 490 Sobradillo, P., Pozo, F. & Agusti, A. P4 medicine: the future around the corner. *Arch Bronconeumol* **47**, 35-40, doi:10.1016/j.arbres.2010.09.009 (2011).
- 491 Ginsburg, G. S. & Phillips, K. A. Precision Medicine: From Science To Value. *Health Aff (Millwood)* **37**, 694-701, doi:10.1377/hlthaff.2017.1624 (2018).
- 492 Tebani, A. & Bekri, S. [The promise of omics in the precision medicine era]. *Rev Med Interne* **43**, 649-660, doi:10.1016/j.revmed.2022.07.009 (2022).
- 493 Poplin, R. *et al.* Prediction of cardiovascular risk factors from retinal fundus photographs via deep learning. *Nat Biomed Eng* **2**, 158-164, doi:10.1038/s41551-018-0195-0 (2018).
- 494 Avati, A. *et al.* Improving palliative care with deep learning. *BMC Med Inform Decis Mak* **18**, 122, doi:10.1186/s12911-018-0677-8 (2018).
- 495 Khan, M. A., Hussain, A., Sher, G., Zubaida, B. & Naeem, M. Genetic Testing of a Large Consanguineous Pakistani Family Affected with Mucopolysaccharidosis III Gamma Through Next-Generation Sequencing. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers* **22**, 541-545, doi:10.1089/gtmb.2018.0123 (2018).
- 496 Tüysüz, B. *et al.* Renal involvement in patients with mucopolysaccharidosis IIIalpha/beta: Causal relation or co-occurrence? *American Journal of Medical Genetics, Part A* **170**, 1187-1195, doi:10.1002/ajmg.a.37543 (2016).

- 497 Adadi, N. *et al.* Post-mortem diagnosis of Pompe disease by exome sequencing in a Moroccan family: A case report. *Journal of Medical Case Reports* **12**, doi:10.1186/s13256-018-1855-0 (2018).
- 498 Vairo, F. P. *et al.* The prevalence of diseases caused by lysosome-related genes in a cohort of undiagnosed patients. *Molecular Genetics and Metabolism Reports* **13**, 46-51, doi:10.1016/j.ymgmr.2017.08.001 (2017).
- 499 Panmontha, W. *et al.* Novel mutations in the FUCA1 gene that cause fucosidosis. *Genetics and Molecular Research* **15**, doi:10.4238/gmr.15038733 (2016).
- 500 Schrader, K. A. *et al.* Using next-generation sequencing for the diagnosis of rare disorders: A family with retinitis pigmentosa and skeletal abnormalities. *Journal of Pathology* **225**, 12-18, doi:10.1002/path.2941 (2011).
- 501 Roosing, S. *et al.* Mutations in MFSD8, encoding a lysosomal membrane protein, are associated with nonsyndromic autosomal recessive macular dystrophy. *Ophthalmology* **122**, 170-179, doi:10.1016/j.ophtha.2014.07.040 (2015).
- 502 Yang, C. *et al.* Identification of five novel mutations causing rare lysosomal storage diseases. *Medical Science Monitor* **25**, 7634-7644, doi:10.12659/MSM.915876 (2019).
- 503 Johnson, K. *et al.* Identification of GAA variants through whole exome sequencing targeted to a cohort of 606 patients with unexplained limb-girdle muscle weakness. *Orphanet Journal of Rare Diseases* **12**, doi:10.1186/s13023-017-0722-1 (2017).
- 504 Froukh, T. First Record Mutations in the Genes ASPA and ARSA Causing Leukodystrophy in Jordan. *BioMed Research International* **2019**, doi:10.1155/2019/7235914 (2019).
- 505 Lee, R. W. *et al.* A Diagnostic Approach for Cerebral Palsy in the Genomic Era. *NeuroMolecular Medicine* **16**, 821-844, doi:10.1007/s12017-014-8331-9 (2014).
- 506 Khan, S. *et al.* Homozygous variants in the HEXB and MBOAT7 genes underlie neurological diseases in consanguineous families. *BMC Medical Genetics* **20**, doi:10.1186/s12881-019-0907-7 (2019).
- 507 Reddy, H. M. *et al.* The sensitivity of exome sequencing in identifying pathogenic mutations for LGMD in the United States. *Journal of Human Genetics* **62**, 243-252, doi:10.1038/jhg.2016.116 (2017).
- 508 Haer-Wigman, L. *et al.* Non-syndromic retinitis pigmentosa due to mutations in the mucopolysaccharidosis type IIIC gene, heparan-alpha-glucosaminide N-acetyltransferase (HGSNAT). *Human Molecular Genetics* **24**, 3742-3751, doi:10.1093/hmg/ddv118 (2015).
- 509 Nashabat, M., Al-Khenaizan, S. & Alfadhel, M. Report of a case that expands the phenotype of infantile krabbe disease. *American Journal of Case Reports* **20**, 643-646, doi:10.12659/AJCR.914275 (2019).
- 510 Nikkel, S. M. *et al.* Whole-exome sequencing expands the phenotype of Hunter syndrome. *Clinical Genetics* **86**, 172-176, doi:10.1111/cge.12236 (2014).
- 511 Al Kaissi, A., Chehida, F. B., Grill, F., Ganger, R. & Kircher, S. G. Turning the backbone into an ankylosed concrete-like structure. *Medicine (United States)* **97**, doi:10.1097/MD.000000000010278 (2018).
- 512 Alavi, A., Nafissi, S., Shamshiri, H., Nejad, M. M. & Elahi, E. Identification of mutation in NPC2 by exome sequencing results in diagnosis of Niemann-Pick disease type C. *Molecular Genetics and Metabolism* **110**, 139-144, doi:10.1016/j.ymgme.2013.05.019 (2013).
- 513 Dougherty, M. *et al.* Genome sequencing in a case of Niemann-Pick type C. *Cold Spring Harbor molecular case studies* **2**, a001222, doi:10.1101/mcs.a001222 (2016).
- 514 Karimzadeh, P. *et al.* Case reports of juvenile GM1 gangliosidosis type II caused by mutation in GLB1 gene. *BMC Medical Genetics* **18**, doi:10.1186/s12881-017-0417-4 (2017).
- 515 Shao, Y. H. *et al.* Mutations in GALC cause late-onset Krabbe disease with predominant cerebellar ataxia. *Neurogenetics* **17**, 137-141, doi:10.1007/s10048-016-0476-2 (2016).
- 516 Brady, J., Trehan, A., Landis, D. & Toro, C. Mucopolysaccharidosis type IIIB (MPS IIIB) masquerading as a behavioural disorder. *BMJ Case Reports* **2013**, doi:10.1136/bcr-2013-009592 (2013).

- 517 Lee, J. S. *et al.* Diagnostic challenge for the rare lysosomal storage disease: Late infantile GM1 gangliosidosis. *Brain and Development* **40**, 383-390, doi:10.1016/j.braindev.2018.01.009 (2018).
- 518 Kim, S. Y. *et al.* Atypical presentation of infantile-onset farber disease with novel ASAH1 mutations. *American Journal of Medical Genetics, Part A* **170**, 3023-3027, doi:10.1002/ajmg.a.37846 (2016).
- 519 Wang, Z. *et al.* Whole-exome sequencing identifies compound heterozygous mutations in ARSA of two siblings presented with atypical onset of metachromatic leukodystrophy from a Chinese pedigree. *Clinica Chimica Acta* **460**, 135-137, doi:10.1016/j.cca.2016.06.038 (2016).
- 520 Yassaee, V. R. *et al.* Clinical, biochemical and molecular features of Iranian families with mucopolysaccharidosis: A case series. *Clinica Chimica Acta* **474**, 88-95, doi:10.1016/j.cca.2017.08.017 (2017).
- 521 Rohanizadegan, M. *et al.* Utility of rapid whole-exome sequencing in the diagnosis of Niemann-Pick disease type C presenting with fetal hydrops and acute liver failure. *Cold Spring Harbor molecular case studies* **3**, doi:10.1101/mcs.a002147 (2017).
- 522 Mori, M. *et al.* Sensitivity of whole exome sequencing in detecting infantile- and late-onset Pompe disease. *Molecular Genetics and Metabolism* **122**, 189-197, doi:10.1016/j.ymgme.2017.10.008 (2017).
- 523 Beck-Wödl, S. *et al.* Homozygous TBC1 domain-containing kinase (TBCK) mutation causes a novel lysosomal storage disease - a new type of neuronal ceroid lipofuscinosis (CLN15)? *Acta neuropathologica communications* **6**, 145, doi:10.1186/s40478-018-0646-6 (2018).
- 524 Dursun, A. *et al.* A probable new syndrome with the storage disease phenotype caused by the VPS33A gene mutation. *Clinical Dysmorphology* **26**, 1-12, doi:10.1097/MCD.000000000000149 (2017).
- 525 *gnomAD*, <<https://gnomad.broadinstitute.org/>> (
- 526 Karczewski, K. J. *et al.* The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature* **581**, 434-443, doi:10.1038/s41586-020-2308-7 (2020).
- 527 The 1000 Genomes Project.
- 528 Sleat, D. E., Gedvilaite, E., Zhang, Y., Lobel, P. & Xing, J. Analysis of large-scale whole exome sequencing data to determine the prevalence of genetically-distinct forms of neuronal ceroid lipofuscinosis. *Gene* **593**, 284-291, doi:10.1016/j.gene.2016.08.031 (2016).
- 529 Zhang, C. K. *et al.* Genome-wide association study of N370S homozygous Gaucher disease reveals the candidacy of CLN8 gene as a genetic modifier contributing to extreme phenotypic variation. *American Journal of Hematology* **87**, 377-383, doi:10.1002/ajh.23118 (2012).
- 530 Lo, S. M. *et al.* Phenotype diversity in type 1 Gaucher disease: Discovering the genetic basis of Gaucher disease/hematologic malignancy phenotype by individual genome analysis. *Blood* **119**, 4731-4740, doi:10.1182/blood-2011-10-386862 (2012).
- 531 Robak, L. A. *et al.* Excessive burden of lysosomal storage disorder gene variants in Parkinson's disease. *Brain* **140**, 3191-3203, doi:10.1093/brain/awx285 (2017).
- 532 Peng, H. *et al.* GLA variation p.E66Q identified as the genetic etiology of Fabry disease using exome sequencing. *Gene* **575**, 363-367, doi:10.1016/j.gene.2015.09.088 (2016).
- 533 Sadakierska-Chudy, A., Kostrzewa, R. M. & Filip, M. A comprehensive view of the epigenetic landscape part I: DNA methylation, passive and active DNA demethylation pathways and histone variants. *Neurotox Res* **27**, 84-97, doi:10.1007/s12640-014-9497-5 (2015).
- 534 Sadakierska-Chudy, A. & Filip, M. A comprehensive view of the epigenetic landscape. Part II: Histone post-translational modification, nucleosome level, and chromatin regulation by ncRNAs. *Neurotox Res* **27**, 172-197, doi:10.1007/s12640-014-9508-6 (2015).
- 535 Kennedy, B. E., Hundert, A. S., Goguen, D., Weaver, I. C. & Karten, B. Presymptomatic Alterations in Amino Acid Metabolism and DNA Methylation in the Cerebellum of a Murine Model of Niemann-Pick Type C Disease. *Am J Pathol* **186**, 1582-1597, doi:10.1016/j.ajpath.2016.02.012 (2016).

- 536 Salvalaio, M. *et al.* Brain RNA-Seq Profiling of the Mucopolysaccharidosis Type II Mouse Model. *Int J Mol Sci* **18**, doi:10.3390/ijms18051072 (2017).
- 537 Parente, M. K., Rozen, R., Cearley, C. N. & Wolfe, J. H. Dysregulation of gene expression in a lysosomal storage disease varies between brain regions implicating unexpected mechanisms of neuropathology. *PLoS One* **7**, e32419, doi:10.1371/journal.pone.0032419 (2012).
- 538 Alam, M. S. *et al.* Genomic Expression Analyses Reveal Lysosomal, Innate Immunity Proteins, as Disease Correlates in Murine Models of a Lysosomal Storage Disorder. *PLoS ONE* **7**, doi:10.1371/journal.pone.0048273 (2012).
- 539 Martin, K. B. *et al.* Identification of Novel Pathways Associated with Patterned Cerebellar Purkinje Neuron Degeneration in Niemann-Pick Disease, Type C1. *Int J Mol Sci* **21**, doi:10.3390/ijms21010292 (2019).
- 540 Gomez-Giro, G. *et al.* Synapse alterations precede neuronal damage and storage pathology in a human cerebral organoid model of CLN3-juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Acta Neuropathol Commun* **7**, 222, doi:10.1186/s40478-019-0871-7 (2019).
- 541 Cougnoux, A. *et al.* Unique molecular signature in mucopolipidosis type IV microglia. *J Neuroinflammation* **16**, 276, doi:10.1186/s12974-019-1672-4 (2019).
- 542 Yu, F. P. S. *et al.* Hepatic pathology and altered gene transcription in a murine model of acid ceramidase deficiency. *Lab Invest* **99**, 1572-1592, doi:10.1038/s41374-019-0271-4 (2019).
- 543 Xu, Y. H. *et al.* Global gene expression profile progression in Gaucher disease mouse models. *BMC Genomics* **12**, doi:10.1186/1471-2164-12-20 (2011).
- 544 Jian, J. *et al.* Chitinase-3-like Protein 1: A Progranulin Downstream Molecule and Potential Biomarker for Gaucher Disease. *EBioMedicine* **28**, 251-260, doi:10.1016/j.ebiom.2018.01.022 (2018).
- 545 Naughton, B. J. *et al.* Amyloidosis, synucleinopathy, and prion encephalopathy in a neuropathic lysosomal storage disease: the CNS-biomarker potential of peripheral blood. *PLoS One* **8**, e80142, doi:10.1371/journal.pone.0080142 (2013).
- 546 Munkacsı, A. B. *et al.* Normalization of hepatic homeostasis in the Npc1nmf164 mouse model of niemann-pick type C disease treated with the histone deacetylase inhibitor vorinostat. *Journal of Biological Chemistry* **292**, 4395-4410, doi:10.1074/jbc.M116.770578 (2017).
- 547 Duncan, F. J. *et al.* Broad functional correction of molecular impairments by systemic delivery of scAAVrh74-hSGSH gene delivery in MPS IIIA mice. *Mol Ther* **23**, 638-647, doi:10.1038/mt.2015.9 (2015).
- 548 Cesani, M. *et al.* Metallothioneins as dynamic markers for brain disease in lysosomal disorders. *Ann Neurol* **75**, 127-137, doi:10.1002/ana.24053 (2014).
- 549 Weinstock, L. D. *et al.* Fingolimod phosphate inhibits astrocyte inflammatory activity in mucopolipidosis IV. *Hum Mol Genet* **27**, 2725-2738, doi:10.1093/hmg/ddy182 (2018).
- 550 Ko, Y. *et al.* Unravelling the mechanism of action of enzyme replacement therapy in Fabry disease. *J Hum Genet* **61**, 143-149, doi:10.1038/jhg.2015.123 (2016).
- 551 Palermo, A. T. *et al.* Transcriptional response to GAA deficiency (Pompe disease) in infantile-onset patients. *Mol Genet Metab* **106**, 287-300, doi:10.1016/j.ymgme.2012.05.004 (2012).
- 552 Tarallo, A. *et al.* microRNAs as biomarkers in Pompe disease. *Genet Med* **21**, 591-600, doi:10.1038/s41436-018-0103-8 (2019).
- 553 Do, H. S. *et al.* Enhanced thrombospondin-1 causes dysfunction of vascular endothelial cells derived from Fabry disease-induced pluripotent stem cells. *EBioMedicine* **52**, 102633, doi:10.1016/j.ebiom.2020.102633 (2020).
- 554 Seemann, S. *et al.* Proteostasis regulators modulate proteasomal activity and gene expression to attenuate multiple phenotypes in Fabry disease. *Biochem J* **477**, 359-380, doi:10.1042/BCJ20190513 (2020).
- 555 Braun, F. *et al.* Accumulation of alpha-synuclein mediates podocyte injury in Fabry nephropathy. *J Clin Invest* **133**, doi:10.1172/JCI157782 (2023).

- 556 Geiger, T., Wehner, A., Schaab, C., Cox, J. & Mann, M. Comparative proteomic analysis of eleven common cell lines reveals ubiquitous but varying expression of most proteins. *Mol Cell Proteomics* **11**, M111 014050, doi:10.1074/mcp.M111.014050 (2012).
- 557 Liebermeister, W. *et al.* Visual account of protein investment in cellular functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 8488-8493, doi:10.1073/pnas.1314810111 (2014).
- 558 Caval, T. *et al.* Targeted Analysis of Lysosomal Directed Proteins and Their Sites of Mannose-6-phosphate Modification. *Mol Cell Proteomics* **18**, 16-27, doi:10.1074/mcp.RA118.000967 (2019).
- 559 Sleat, D. E. *et al.* Proteomic analysis of mouse models of Niemann-Pick C disease reveals alterations in the steady-state levels of lysosomal proteins within the brain. *Proteomics* **12**, 3499-3509, doi:10.1002/pmic.201200205 (2012).
- 560 Pereira, E. M. *et al.* Characterization and phosphoproteomic analysis of a human immortalized podocyte model of Fabry disease generated using CRISPR/Cas9 technology. *Am J Physiol Renal Physiol* **311**, F1015-F1024, doi:10.1152/ajprenal.00283.2016 (2016).
- 561 Birket, M. J. *et al.* A Human Stem Cell Model of Fabry Disease Implicates LIMP-2 Accumulation in Cardiomyocyte Pathology. *Stem Cell Reports* **13**, 380-393, doi:10.1016/j.stemcr.2019.07.004 (2019).
- 562 Singh, J. *et al.* Systematic Comparison of Strategies for the Enrichment of Lysosomes by Data Independent Acquisition. *J Proteome Res* **19**, 371-381, doi:10.1021/acs.jproteome.9b00580 (2020).
- 563 Cigna, D. *et al.* Alteration of proteomic profiles in PBMC isolated from patients with Fabry disease: preliminary findings. *Mol Biosyst* **9**, 1162-1168, doi:10.1039/c3mb25402j (2013).
- 564 Cologna, S. M. *et al.* Quantitative proteomic analysis of Niemann-Pick disease, type C1 cerebellum identifies protein biomarkers and provides pathological insight. *PLoS One* **7**, e47845, doi:10.1371/journal.pone.0047845 (2012).
- 565 Pergande, M. R., Nguyen, T. T. A., Haney-Ball, C., Davidson, C. D. & Cologna, S. M. Quantitative, Label-Free Proteomics in the Symptomatic Niemann-Pick, Type C1 Mouse Model Using Standard Flow Liquid Chromatography and Thermal Focusing Electrospray Ionization. *Proteomics* **19**, e1800432, doi:10.1002/pmic.201800432 (2019).
- 566 Heo, S. H. *et al.* Fabry disease: characterisation of the plasma proteome pre- and post-enzyme replacement therapy. *J Med Genet* **54**, 771-780, doi:10.1136/jmedgenet-2017-104704 (2017).
- 567 Hollander, Z. *et al.* Gender-specific plasma proteomic biomarkers in patients with Anderson-Fabry disease. *Eur J Heart Fail* **17**, 291-300, doi:10.1002/ejhf.230 (2015).
- 568 Chien, Y. *et al.* Inhibition of Arachidonate 12/15-Lipoxygenase Improves alpha-Galactosidase Efficacy in iPSC-Derived Cardiomyocytes from Fabry Patients. *Int J Mol Sci* **19**, doi:10.3390/ijms19051480 (2018).
- 569 Slaats, G. G. *et al.* Urine-derived cells: a promising diagnostic tool in Fabry disease patients. *Sci Rep* **8**, 11042, doi:10.1038/s41598-018-29240-w (2018).
- 570 Kistler, A. D. *et al.* A distinct urinary biomarker pattern characteristic of female Fabry patients that mirrors response to enzyme replacement therapy. *PLoS One* **6**, e20534, doi:10.1371/journal.pone.0020534 (2011).
- 571 Manwaring, V. *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* **12**, 2013-2021, doi:10.1021/pr301200e (2013).
- 572 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* **126**, 169-182, doi:10.1016/j.ymgme.2018.11.005 (2019).
- 573 Matafora, V. *et al.* Early markers of Fabry disease revealed by proteomics. *Mol Biosyst* **11**, 1543-1551, doi:10.1039/c4mb00707g (2015).

- 574 Vojtova, L. *et al.* Study of urinary proteomes in Anderson-Fabry disease. *Ren Fail* **32**, 1202-1209, doi:10.3109/0886022X.2010.516859 (2010).
- 575 Vanier, M. T. Niemann-Pick disease type C. *Orphanet J Rare Dis* **5**, 16, doi:10.1186/1750-1172-5-16 (2010).
- 576 Rauniyar, N. *et al.* Quantitative Proteomics of Human Fibroblasts with I1061T Mutation in Niemann-Pick C1 (NPC1) Protein Provides Insights into the Disease Pathogenesis. *Mol Cell Proteomics* **14**, 1734-1749, doi:10.1074/mcp.M114.045609 (2015).
- 577 Balboa, E. *et al.* Proteomic Analysis of Niemann-Pick Type C Hepatocytes Reveals Potential Therapeutic Targets for Liver Damage. *Cells* **10**, doi:10.3390/cells10082159 (2021).
- 578 Yang, F. *et al.* Proteomics of the corpus callosum to identify novel factors involved in hypomyelinated Niemann-Pick Type C disease mice. *Mol Brain* **12**, 17, doi:10.1186/s13041-019-0440-9 (2019).
- 579 Li, R. *et al.* Analytical Characterization of Methyl-beta-Cyclodextrin for Pharmacological Activity to Reduce Lysosomal Cholesterol Accumulation in Niemann-Pick Disease Type C1 Cells. *Assay Drug Dev Technol* **15**, 154-166, doi:10.1089/adt.2017.774 (2017).
- 580 Szente, L., Singhal, A., Domokos, A. & Song, B. Cyclodextrins: Assessing the Impact of Cavity Size, Occupancy, and Substitutions on Cytotoxicity and Cholesterol Homeostasis. *Molecules* **23**, doi:10.3390/molecules23051228 (2018).
- 581 Singhal, A., Szente, L., Hildreth, J. E. K. & Song, B. Hydroxypropyl-beta and -gamma cyclodextrins rescue cholesterol accumulation in Niemann-Pick C1 mutant cell via lysosome-associated membrane protein 1. *Cell Death Dis* **9**, 1019, doi:10.1038/s41419-018-1056-1 (2018).
- 582 Subramanian, K., Rauniyar, N., Lavalley-Adam, M., Yates, J. R., 3rd & Balch, W. E. Quantitative Analysis of the Proteome Response to the Histone Deacetylase Inhibitor (HDACi) Vorinostat in Niemann-Pick Type C1 disease. *Mol Cell Proteomics* **16**, 1938-1957, doi:10.1074/mcp.M116.064949 (2017).
- 583 Andrzejewska, Z. *et al.* Cystinosin is a Component of the Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase-Ragulator-Rag Complex Controlling Mammalian Target of Rapamycin Complex 1 Signaling. *J Am Soc Nephrol* **27**, 1678-1688, doi:10.1681/ASN.2014090937 (2016).
- 584 Nelvagal, H. R. *et al.* Comparative proteomic profiling reveals mechanisms for early spinal cord vulnerability in CLN1 disease. *Sci Rep* **10**, 15157, doi:10.1038/s41598-020-72075-7 (2020).
- 585 Michailowsky, V. *et al.* Defects in sarcolemma repair and skeletal muscle function after injury in a mouse model of Niemann-Pick type A/B disease. *Skelet Muscle* **9**, 1, doi:10.1186/s13395-018-0187-5 (2019).
- 586 Becker, T. *et al.* AMPylation profiling during neuronal differentiation reveals extensive variation on lysosomal proteins. *iScience* **24**, 103521, doi:10.1016/j.isci.2021.103521 (2021).
- 587 Riera-Tur, I. *et al.* Amyloid-like aggregating proteins cause lysosomal defects in neurons via gain-of-function toxicity. *Life Sci Alliance* **5**, doi:10.26508/lsa.202101185 (2022).
- 588 Schondorf, D. C. *et al.* iPSC-derived neurons from GBA1-associated Parkinson's disease patients show autophagic defects and impaired calcium homeostasis. *Nat Commun* **5**, 4028, doi:10.1038/ncomms5028 (2014).
- 589 Schmidtke, C. *et al.* Lysosomal proteome analysis reveals that CLN3-defective cells have multiple enzyme deficiencies associated with changes in intracellular trafficking. *J Biol Chem* **294**, 9592-9604, doi:10.1074/jbc.RA119.008852 (2019).
- 590 Danyukova, T. *et al.* Loss of CLN7 results in depletion of soluble lysosomal proteins and impaired mTOR reactivation. *Hum Mol Genet* **27**, 1711-1722, doi:10.1093/hmg/ddy076 (2018).
- 591 Odaka, H. *et al.* An iPSC-based neural model of sialidosis uncovers glycolytic impairment-causing presynaptic dysfunction and deregulation of Ca(2+) dynamics. *Neurobiol Dis* **152**, 105279, doi:10.1016/j.nbd.2021.105279 (2021).

- 592 Ou, L., Przybilla, M. J. & Whitley, C. B. Proteomic analysis of mucopolysaccharidosis I mouse  
brain with two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Mol Genet Metab* **120**, 101-  
110, doi:10.1016/j.ymgme.2016.10.001 (2017).
- 593 Parente, M. K., Rozen, R., Seeholzer, S. H. & Wolfe, J. H. Integrated analysis of proteome and  
transcriptome changes in the mucopolysaccharidosis type VII mouse hippocampus. *Mol  
Genet Metab* **118**, 41-54, doi:10.1016/j.ymgme.2016.03.003 (2016).
- 594 Ong, D. S. *et al.* FKBP10 depletion enhances glucocerebrosidase proteostasis in Gaucher  
disease fibroblasts. *Chem Biol* **20**, 403-415, doi:10.1016/j.chembiol.2012.11.014 (2013).
- 595 Pellegrini, D. *et al.* Quantitative Microproteomics Based Characterization of the Central and  
Peripheral Nervous System of a Mouse Model of Krabbe Disease. *Mol Cell Proteomics* **18**,  
1227-1241, doi:10.1074/mcp.RA118.001267 (2019).
- 596 Moriggi, M. *et al.* Muscle Proteomic Profile before and after Enzyme Replacement Therapy in  
Late-Onset Pompe Disease. *Int J Mol Sci* **22**, 1-20, doi:10.3390/ijms22062850 (2021).
- 597 Heywood, W. E. *et al.* Proteomic Discovery and Development of a Multiplexed Targeted  
MRM-LC-MS/MS Assay for Urine Biomarkers of Extracellular Matrix Disruption in  
Mucopolysaccharidoses I, II, and VI. *Anal Chem* **87**, 12238-12244,  
doi:10.1021/acs.analchem.5b03232 (2015).
- 598 Alvarez, V. J. *et al.* Characterization of New Proteomic Biomarker Candidates in  
Mucopolysaccharidosis Type IVA. *Int J Mol Sci* **22**, 1-22, doi:10.3390/ijms22010226 (2020).
- 599 Sleat, D. E. *et al.* Analysis of Brain and Cerebrospinal Fluid from Mouse Models of the Three  
Major Forms of Neuronal Ceroid Lipofuscinosis Reveals Changes in the Lysosomal Proteome.  
*Mol Cell Proteomics* **18**, 2244-2261, doi:10.1074/mcp.RA119.001587 (2019).
- 600 Zigdon, H. *et al.* Identification of a biomarker in cerebrospinal fluid for neuronopathic forms  
of Gaucher disease. *PLoS One* **10**, e0120194, doi:10.1371/journal.pone.0120194 (2015).
- 601 Alvarez, J. V. *et al.* Proteomic Analysis in Morquio A Cells Treated with Immobilized Enzymatic  
Replacement Therapy on Nanostructured Lipid Systems. *Int J Mol Sci* **20**,  
doi:10.3390/ijms20184610 (2019).
- 602 Liebau, M. C. *et al.* Dysregulated autophagy contributes to podocyte damage in Fabry's  
disease. *PLoS One* **8**, e63506, doi:10.1371/journal.pone.0063506 (2013).
- 603 Ravarotto, V. *et al.* Oxidative Stress and Cardiovascular-Renal Damage in Fabry Disease: Is  
There Room for a Pathophysiological Involvement? *J Clin Med* **7**, doi:10.3390/jcm7110409  
(2018).
- 604 Song, H. Y. *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* **8**, 327, doi:10.3390/cells8040327 (2019).
- 605 Xu, S., Sleat, D. E., Jadot, M. & Lobel, P. Glial fibrillary acidic protein is elevated in the  
lysosomal storage disease classical late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis, but is not a  
component of the storage material. *Biochem J* **428**, 355-362, doi:10.1042/BJ20100128  
(2010).
- 606 Oliver, S. G., Winson, M. K., Kell, D. B. & Baganz, F. Systematic functional analysis of the yeast  
genome. *Trends Biotechnol* **16**, 373-378, doi:10.1016/s0167-7799(98)01214-1 (1998).
- 607 Nicholson, J. K., Lindon, J. C. & Holmes, E. 'Metabonomics': understanding the metabolic  
responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis  
of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica* **29**, 1181-1189,  
doi:10.1080/004982599238047 (1999).
- 608 Alonso, A., Marsal, S. & Julia, A. Analytical methods in untargeted metabolomics: state of the  
art in 2015. *Front Bioeng Biotechnol* **3**, 23, doi:10.3389/fbioe.2015.00023 (2015).
- 609 Vinaixa, M. *et al.* Mass spectral databases for LC/MS- and GC/MS-based metabolomics: State  
of the field and future prospects. *Trends in Analytical Chemistry* **78**, 23-35,  
doi:<https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.09.005> (2016).
- 610 Bujak, R., Struck-Lewicka, W., Markuszewski, M. J. & Kaliszan, R. Metabolomics for laboratory  
diagnostics. *J Pharm Biomed Anal* **113**, 108-120, doi:10.1016/j.jpba.2014.12.017 (2015).

- 611 Jacob, M., Lopata, A. L., Dasouki, M. & Abdel Rahman, A. M. Metabolomics toward  
personalized medicine. *Mass Spectrom Rev* **38**, 221-238, doi:10.1002/mas.21548 (2019).
- 612 Yoshida, T. *et al.* A Skeletal Muscle Model of Infantile-onset Pompe Disease with Patient-  
specific iPS Cells. *Sci Rep* **7**, 13473, doi:10.1038/s41598-017-14063-y (2017).
- 613 Sato, Y. *et al.* Metabolomic Profiling of Pompe Disease-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived  
Cardiomyocytes Reveals That Oxidative Stress Is Associated with Cardiac and Skeletal Muscle  
Pathology. *Stem Cells Transl Med* **6**, 31-39, doi:10.5966/sctm.2015-0409 (2017).
- 614 Lim, J. A., Sun, B., Puertollano, R. & Raben, N. Therapeutic Benefit of Autophagy Modulation  
in Pompe Disease. *Mol Ther* **26**, 1783-1796, doi:10.1016/j.ymthe.2018.04.025 (2018).
- 615 Evers, B. M. *et al.* Lipidomic and Transcriptomic Basis of Lysosomal Dysfunction in  
Progranulin Deficiency. *Cell Rep* **20**, 2565-2574, doi:10.1016/j.celrep.2017.08.056 (2017).
- 616 Salazar, D. A. *et al.* Systems biology study of mucopolysaccharidosis using a human metabolic  
reconstruction network. *Mol Genet Metab* **117**, 129-139, doi:10.1016/j.ymgme.2015.08.001  
(2016).
- 617 Utz, J. R., Crutcher, T., Schneider, J., Sorgen, P. & Whitley, C. B. Biomarkers of central nervous  
system inflammation in infantile and juvenile gangliosidoses. *Mol Genet Metab* **114**, 274-280,  
doi:10.1016/j.ymgme.2014.11.015 (2015).
- 618 Maekawa, M. *et al.* Focused metabolomics using liquid chromatography/electrospray  
ionization tandem mass spectrometry for analysis of urinary conjugated cholesterol  
metabolites from patients with Niemann-Pick disease type C and 3beta-hydroxysteroid  
dehydrogenase deficiency. *Ann Clin Biochem* **52**, 576-587, doi:10.1177/0004563214568871  
(2015).
- 619 Ruiz-Rodado, V. *et al.* (1)H NMR-Linked Metabolomics Analysis of Liver from a Mouse Model  
of NP-C1 Disease. *J Proteome Res* **15**, 3511-3527, doi:10.1021/acs.jproteome.6b00238  
(2016).
- 620 Dupont, F. O., Gagnon, R., Boutin, M. & Auray-Blais, C. A metabolomic study reveals novel  
plasma lyso-Gb3 analogs as Fabry disease biomarkers. *Curr Med Chem* **20**, 280-288,  
doi:10.2174/092986713804806685 (2013).
- 621 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* **85**, 9039-9048, doi:10.1021/ac401542k (2013).
- 622 Boutin, M. & Auray-Blais, C. Metabolomic discovery of novel urinary galabiosylceramide  
analogues as Fabry disease biomarkers. *J Am Soc Mass Spectrom* **26**, 499-510,  
doi:10.1007/s13361-014-1060-3 (2015).
- 623 Auray-Blais, C. & Boutin, M. Novel gb(3) isoforms detected in urine of fabry disease patients:  
a metabolomic study. *Curr Med Chem* **19**, 3241-3252, doi:10.2174/092986712800784739  
(2012).
- 624 Auray-Blais, C. *et al.* Urinary globotriaosylsphingosine-related biomarkers for Fabry disease  
targeted by metabolomics. *Anal Chem* **84**, 2745-2753, doi:10.1021/ac203433e (2012).
- 625 Ducatez, F. *et al.* Parsing Fabry Disease Metabolic Plasticity Using Metabolomics. *J Pers Med*  
**11**, doi:10.3390/jpm11090898 (2021).
- 626 Subramanian, I., Verma, S., Kumar, S., Jere, A. & Anamika, K. Multi-omics Data Integration,  
Interpretation, and Its Application. *Bioinform Biol Insights* **14**, 1177932219899051,  
doi:10.1177/1177932219899051 (2020).
- 627 Yugi, K., Kubota, H., Hatano, A. & Kuroda, S. Trans-Omics: How To Reconstruct Biochemical  
Networks Across Multiple 'Omic' Layers. *Trends Biotechnol* **34**, 276-290,  
doi:10.1016/j.tibtech.2015.12.013 (2016).
- 628 Hasin, Y., Seldin, M. & Lusi, A. Multi-omics approaches to disease. *Genome Biol* **18**, 83,  
doi:10.1186/s13059-017-1215-1 (2017).
- 629 Kang, M., Ko, E. & Mersha, T. B. A roadmap for multi-omics data integration using deep  
learning. *Brief Bioinform* **23**, doi:10.1093/bib/bbab454 (2022).

- 630 Sen, P. & Oresic, M. Integrating Omics Data in Genome-Scale Metabolic Modeling: A Methodological Perspective for Precision Medicine. *Metabolites* **13**, doi:10.3390/metabo13070855 (2023).
- 631 Zimmermann, J., Kaleta, C. & Waschina, S. gapseq: informed prediction of bacterial metabolic pathways and reconstruction of accurate metabolic models. *Genome Biol* **22**, 81, doi:10.1186/s13059-021-02295-1 (2021).
- 632 Wang, H. *et al.* Genome-scale metabolic network reconstruction of model animals as a platform for translational research. *Proc Natl Acad Sci U S A* **118**, doi:10.1073/pnas.2102344118 (2021).
- 633 Angione, C. Human Systems Biology and Metabolic Modelling: A Review-From Disease Metabolism to Precision Medicine. *Biomed Res Int* **2019**, 8304260, doi:10.1155/2019/8304260 (2019).
- 634 Oh, E. S. *et al.* Comparison of conventional ELISA with electrochemiluminescence technology for detection of amyloid-beta in plasma. *J Alzheimers Dis* **21**, 769-773, doi:10.3233/JAD-2010-100456 (2010).
- 635 Anagu, L. O. & Andoh, N. E. in *Vaccinology and Methods in Vaccine Research* (eds R. Ashfield, A. N. Oli, C. Esimone, & L. Anagu) Ch. Chapter 4, 95-131 (2022).
- 636 Leng, S. X. *et al.* ELISA and multiplex technologies for cytokine measurement in inflammation and aging research. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **63**, 879-884, doi:10.1093/gerona/63.8.879 (2008).
- 637 Guglielmo-Viret, V. & Thullier, P. Comparison of an electrochemiluminescence assay in plate format over a colorimetric ELISA, for the detection of ricin B chain (RCA-B). *J Immunol Methods* **328**, 70-78, doi:10.1016/j.jim.2007.08.003 (2007).
- 638 Feng, H., Qin, Z. & Zhang, X. Opportunities and methods for studying alternative splicing in cancer with RNA-Seq. *Cancer Lett* **340**, 179-191, doi:10.1016/j.canlet.2012.11.010 (2013).
- 639 Ewels, P. A. *et al.* The nf-core framework for community-curated bioinformatics pipelines. *Nat Biotechnol* **38**, 276-278, doi:10.1038/s41587-020-0439-x (2020).
- 640 Soriano Lopes, A., Santa Cruz, E. C., Sussulini, A. & Lassen, A. in *Metabolomics: From Fundamentals to Clinical Applications Advances in Experimental Medicine and Biology* (ed A. Sussulini) 77-98 (Springer Cham, 2017).
- 641 Adaway, J. E., Keevil, B. G. & Owen, L. J. Liquid chromatography tandem mass spectrometry in the clinical laboratory. *Ann Clin Biochem* **52**, 18-38, doi:10.1177/0004563214557678 (2015).
- 642 Del Pino, M. *et al.* Fabry Nephropathy: An Evidence-Based Narrative Review. *Kidney Blood Press Res* **43**, 406-421, doi:10.1159/000488121 (2018).
- 643 Clevers, H. & Nusse, R. Wnt/beta-catenin signaling and disease. *Cell* **149**, 1192-1205, doi:10.1016/j.cell.2012.05.012 (2012).
- 644 Zhao, B., Tumaneng, K. & Guan, K. L. The Hippo pathway in organ size control, tissue regeneration and stem cell self-renewal. *Nat Cell Biol* **13**, 877-883, doi:10.1038/ncb2303 (2011).
- 645 Hui, Q., Jin, Z., Li, X., Liu, C. & Wang, X. FGF Family: From Drug Development to Clinical Application. *Int J Mol Sci* **19**, doi:10.3390/ijms19071875 (2018).
- 646 Murakami, M. & Simons, M. Fibroblast growth factor regulation of neovascularization. *Curr Opin Hematol* **15**, 215-220, doi:10.1097/MOH.0b013e3282f97d98 (2008).
- 647 Lee, M. H., Choi, E. N., Jeon, Y. J. & Jung, S. C. Possible role of transforming growth factor-beta1 and vascular endothelial growth factor in Fabry disease nephropathy. *Int J Mol Med* **30**, 1275-1280, doi:10.3892/ijmm.2012.1139 (2012).
- 648 Krawczenko, A., Kieda, C. & Dus, D. The biological role and potential therapeutic application of interleukin 7. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **53**, 518-525 (2005).
- 649 Namen, A. E. *et al.* Stimulation of B-cell progenitors by cloned murine interleukin-7. *Nature* **333**, 571-573, doi:10.1038/333571a0 (1988).

- 650 Barata, J. T., Durum, S. K. & Seddon, B. Flip the coin: IL-7 and IL-7R in health and disease. *Nat Immunol* **20**, 1584-1593, doi:10.1038/s41590-019-0479-x (2019).
- 651 Zhang, C. *et al.* Quantitative profiling of glycerophospholipids during mouse and human macrophage differentiation using targeted mass spectrometry. *Sci Rep* **7**, 412, doi:10.1038/s41598-017-00341-2 (2017).
- 652 Messelodi, D. *et al.* Neuronopathic Gaucher disease models reveal defects in cell growth promoted by Hippo pathway activation. *Commun Biol* **6**, 431, doi:10.1038/s42003-023-04813-2 (2023).
- 653 Kannan, M., Lahiri, S., Liu, L. K., Choudhary, V. & Prinz, W. A. Phosphatidylserine synthesis at membrane contact sites promotes its transport out of the ER. *J Lipid Res* **58**, 553-562, doi:10.1194/jlr.M072959 (2017).
- 654 Baydakova, G. *et al.* Elevated LysoGb3 Concentration in the Neuronopathic Forms of Mucopolysaccharidoses. *Diagnostics (Basel)* **10**, doi:10.3390/diagnostics10030155 (2020).
- 655 Machann, W. *et al.* Cardiac energy metabolism is disturbed in Fabry disease and improves with enzyme replacement therapy using recombinant human galactosidase A. *Eur J Heart Fail* **13**, 278-283, doi:10.1093/eurjhf/hfq211 (2011).
- 656 Rhie, A. *et al.* The complete sequence of a human Y chromosome. *Nature*, doi:10.1038/s41586-023-06457-y (2023).
- 657 Heumos, L. *et al.* Best practices for single-cell analysis across modalities. *Nat Rev Genet* **24**, 550-572, doi:10.1038/s41576-023-00586-w (2023).



## Apport des sciences omiques dans la maladie de Fabry

### Résumé

La maladie de Fabry est une maladie lysosomale complexe, impliquant divers mécanismes cellulaires, notamment une dysfonction lysosomale, une altération de l'autophagie et des anomalies mitochondriales. Il s'agit d'une maladie multisystémique dont la sévérité est variable, avec un phénotype classique sévère, débutant dans l'enfance, et un phénotype non-classique, plus modéré et plus tardif. Le lyso-Gb3 est le seul biomarqueur spécifique disponible et celui-ci est imparfait, notamment chez les femmes, dans certaines formes non-classiques et pour le suivi de l'évolution sous traitement. Les mécanismes physiopathologiques qui sous-tendent cette maladie ne sont pas complètement élucidés. Des technologies avancées, tant sur le plan analytique (sciences omiques) qu'informatique, permettent d'explorer le vivant à des résolutions jusqu'ici inégalées. L'objectif de ce travail était de mettre en œuvre des approches omiques afin de mieux comprendre la physiopathologie de la maladie de Fabry, de caractériser de nouveaux biomarqueurs et d'identifier de nouvelles approches thérapeutiques. Nous avons eu recours à une approche transcriptomique couplée à la modélisation métabolique à l'échelle du génome, fournissant ainsi des informations précieuses sur les perturbations métaboliques qui se produisent dans la maladie de Fabry. Nous avons ensuite validé dans une cohorte indépendante l'élévation de la concentration plasmatique de deux potentiels biomarqueurs, FGF2 et IL-7, mis en évidence par une approche protéomique. Une approche métabolomique dans un modèle cellulaire de maladie de Fabry a permis de caractériser les effets de ces deux protéines, notamment une perturbation de la composition lipidique des membranes cellulaires. En conclusion, les outils de la biologie des systèmes sont pertinents pour l'étude des maladies héréditaires du métabolisme comme la maladie de Fabry car ils permettent une meilleure compréhension de la physiopathologie ainsi que la découverte et la caractérisation de nouveaux biomarqueurs et de nouvelles cibles thérapeutiques.

**Mots clés :** maladie de Fabry, omiques, médecine de précision, biologie des systèmes, lysosome, podocytes, transcriptomique, métabolomique, biomarqueurs

## Omics sciences in Fabry disease

### Abstract

Fabry disease is a complex lysosomal disease, involving various cellular mechanisms, including lysosomal dysfunction, altered autophagy and mitochondrial abnormalities. It is a multisystem disease of variable severity, with a severe classical phenotype beginning in childhood, and a more moderate non-classical phenotype later in life. Lyso-Gb3 is the only specific biomarker available, but it is imperfect, particularly in women, in certain non-classical forms and for monitoring progression under treatment. The pathophysiological mechanisms underlying this disease have not been fully elucidated. Advanced technologies, both analytical (omics sciences) and computational, make it possible to explore living organisms at previously unattainable resolutions. The aim of this work was to apply omics approaches to better understand the pathophysiology of Fabry disease, characterize new biomarkers and identify new therapeutic approaches. We implemented a transcriptomic approach coupled with genome-scale metabolic modeling, providing valuable insights into the metabolic perturbations that occur in Fabry disease. We then validated in an independent cohort the elevated plasma concentration of two potential biomarkers, FGF2 and IL-7, uncovered by a proteomic approach. A metabolomic approach in a cellular model of Fabry disease enabled us to characterize the effects of these two proteins, notably a disturbance in the lipid composition of cell membranes. In conclusion, systems biology approaches are relevant tools in the study of inborn errors of metabolism, as they enable to further our understanding of Fabry disease pathophysiology as well as the discovery and characterization of new biomarkers and therapeutic targets.

**Key words:** Fabry disease, omics, precision medicine, systems biology, lysosome, podocytes, transcriptomics, metabolomics, biomarkers